

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA, ÁREA DE GENÉTICA**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO AGRARIO DE CASTILLA Y LEÓN**  
**(ITACyL)**



**VNiVERSiDAD**  
**D SALAMANCA**



**LOS DECAIMIENTOS DE LA VID EN CASTILLA Y LEÓN: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y MÉTODOS DE CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID (*VITIS VINIFERA*).**

**Rebeca Cobos Román**

**TESIS DOCTORAL**

**2008**



# **UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA  
ÁREA DE GENÉTICA**

## **LOS DECAIMIENTOS DE LA VID EN CASTILLA Y LEÓN: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y MÉTODOS DE CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID (*VITIS VINIFERA*).**

Memoria que presenta Dña. Rebeca Cobos Román para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 1 de Septiembre de 2008



**DRA. TERESA MARTÍN VILLULLAS, INVESTIGADORA DEL  
DEPARTAMENTO DE VITICULTURA DEL INSTITUTO  
TECNOLÓGICO AGRARIO DE CASTILLA Y LEÓN**

**AUTORIZA:**

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Los decaimientos de la vid en Castilla y León: aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*)”, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, que ha sido realizada por Dña. Rebeca Cobos Román bajo mi dirección, en el Departamento de Viticultura del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.

En Valladolid, a 1 de Septiembre de 2008

Fdo. Dra. Teresa Martín Villullas



**DRA. TERESA MARTÍN VILLULLAS, INVESTIGADORA DEL  
DEPARTAMENTO DE VITICULTURA DEL INSTITUTO  
TECNOLÓGICO AGRARIO DE CASTILLA Y LEÓN**

**CERTIFICO:**

Que Dña. Rebeca Cobos Román ha realizado en el Departamento de Viticultura del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, el trabajo titulado “Los decaimientos de la vid en Castilla y León: aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*)”, bajo mi dirección para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendiendo el presente certificado en Valladolid, a 1 de Septiembre de 2008.

Fdo. Dra. Teresa Martín Villullas





**Dr. ANGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI, DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.**

**CERTIFICO:**

Que la memoria titulada “Los decaimientos de la vid en Castilla y León: aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*)”, presentada por Dña. Rebeca Cobos Román para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la doctora Teresa Martín Villullas, en el Departamento de Viticultura del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, y tutelada por el doctor Ernesto Pérez Benito, profesor titular del área de genética del departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, expido el presente certificado en Salamanca, a 1 de Septiembre de 2008.

Fdo. Dr. Angel Domínguez Olavarri



Dña. Teresa Martín Villullas, investigadora del Departamento de Viticultura del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, y directora de la Tesis Doctoral que con el título “Los decaimientos de la vid en Castilla y León: aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*)”, ha registrado en el departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca la estudiante de doctorado Dña. Rebeca Cobos Román, hago constar:

Que Dña. Rebeca Cobos Román ha trabajado activamente durante los últimos cuatro años bajo mi supervisión en el Departamento de Viticultura del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Su progreso durante estos cuatro años ha sido muy notable y evidente, habiendo alcanzado en la actualidad una gran madurez investigadora que le capacita para la elaboración de la memoria de su trabajo de Tesis Doctoral y para la presentación y defensa de la misma.

Habiendo sido supervisora del trabajo realizado y habiendo seguido la formación y los progresos de Dña. Rebeca Cobos Román, mediante la presente **autorizo la presentación y defensa** de su memoria de Tesis Doctoral que con el título arriba indicado la alumna deposita en la Secretaría del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca para iniciar su tramitación.

Y para que así conste, firmo la presente

en Salamanca, a 1 de Septiembre de 2008.

Dra. Teresa Martín Villullas  
Investigadora  
Dpto. de Viticultura  
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y  
GENÉTICA**

Edificio Departamental  
Plaza Doctores de la Reina, s/n – 37007 Salamanca  
Tel . (34) 923 29 45 32 Fax . (34) 923 22 48 76  
www.usal.es

D. Ernesto Pérez Benito, Profesor Titular de Genética, del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, como Tutor de la alumna de doctorado Rebeca Cobos Román, hago constar:

Que Dña. Rebeca Cobos Román ha realizado su Tesis Doctoral en el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) bajo la dirección de la doctora Teresa Martín Villullas trabajando en el tema que da título a su memoria de Tesis Doctoral: "Los decaimientos de la vid en Castilla y León: aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*)", habiendo cursado el programa de Doctorado que oferta el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca durante el bienio 2003-2005 y obteniendo finalmente su DEA el 21 de Noviembre de 2005.

Teniendo en cuenta el trabajo realizado y los progresos alcanzados por Dña. Rebeca Cobos Román, como tutor de su Tesis Doctoral mediante la presente propongo y **autorizo la presentación y defensa** de su memoria de Tesis Doctoral que con el título arriba indicado la alumna deposita en la Secretaría del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca para iniciar su tramitación y optar a la obtención del título de Doctor en Bioquímica.

Y para que así conste, firmo la presente

en Salamanca, a 1 de Septiembre de 2008.

Dr. Ernesto Pérez Benito  
Prof. Titular de Genética  
Dpto. de Microbiología y Genética  
Universidad de Salamanca



## Agradecimientos

Durante los últimos cinco años han sido muchas las personas que han pasado por mi vida, y todas ellas han contribuido de alguna manera a que este trabajo salga adelante, por ello me gustaría expresarles mi agradecimiento:

A la Dra. Teresa Martín Villullas, directora de esta Tesis, por haberme dado la oportunidad de iniciarme en la investigación, y descubrir a cada paso un mundo que me apasiona. Por su dedicación, por su paciencia, pero sobre todo por su amistad y su cercanía.

Al Dr. Ernesto Pérez Benito, tutor de esta Tesis, porque siempre estuvo al otro lado del teléfono para facilitarme todos los papeleos que conlleva escribir una tesis fuera del seno de la Universidad. A Iñigo Zabalgogazcoa y a Belén Suárez, por ayudarme a dar los primeros pasos en el laboratorio.

Al Dr. Jesús Yuste Bombín, y a todos los miembros del Departamento de Viticultura del ITACyL, por apostar por este trabajo, y permitirme desarrollarlo dentro de su departamento.

A toda mi gente del ITACyL, porque durante estos años, esa ha sido mi casa. Sería imposible nombrar a todas las personas que han pasado por el laboratorio, pero cada uno ha contribuido con su pequeño granito de arena. A Laura R., Laura M., Arturo, Nuria, Mari, Teresa, Elena, Celia... por crear un ambiente de trabajo inmejorable. A M<sup>a</sup> Cruz, Alberto y M<sup>a</sup> Ángeles, por sus buenos consejos. A Marta Hernández, por dedicarme todo el tiempo que no tiene, por estar siempre dispuesta a ayudarme en todos los contratiempos que se han podido presentar, y por esa mentalidad práctica que me ha facilitado tanto el trabajo; y a todo el Departamento de Biología Molecular: Lorena, Sonia, Elena, Raquel, y de una manera especial a Noemí y a Marta, porque han estado siempre a mi lado, disfrutando de los buenos momentos y animándome en los momentos en los que parece imposible seguir adelante, sin duda haberlas conocido y disfrutar de su amistad es una de las mejores cosas que me llevo de estos cinco años.

A los técnicos de los consejos de las distintas DD.OO. de Castilla y León, especialmente a Santiago Cepeda, Vanesa Ortega y Mario Castaño, por su ayuda en la elección de las parcelas.

Al Dr. Juan José Rubio Coque, por darme la oportunidad de seguir trabajando en investigación, por confiar en mí y anteponer siempre los intereses de los demás a los suyos propios, son esas las pequeñas características que marcan la calidad de las personas. A mi familia leonesa, con domicilio en el laboratorio 203: Silvia, Alberto, Rosa y el anexo Visi, por esas cañitas en los momentos de bloqueo, que han hecho más llevadera la elaboración de esta memoria, gracias por vuestra amistad.

A Nacho, por sufrir en primera persona la redacción de esta memoria, por su infinita paciencia, por soportar los continuos bajones y celebrar cada uno de los pequeños avances, por ofrecerme mucho más que su amistad.

A mis amigos de toda la vida, Sara, Natalia, Esther, Nuri, Henar N., Henar P. y Elena por permanecer a mi lado a pesar de las distancias. A Miguel, porque sin su ayuda nunca hubiera llegado hasta aquí, por dedicarme los últimos diez años, y brindarme su amistad incondicional.

A mi familia: a Esther por sus interminables parrafadas; a Julio, por estar siempre ahí, en silencio; a Chus, por ser mi otra madre; a Belén por sus consultas psicológicas por teléfono, que han hecho que 800 Km. parecieran tan sólo metros, y a esas noches de hospital que seguro que no olvidaremos...a mi padre que me ha inculcado un afán de superación sin el que hubiera sido posible concluir este trabajo, y a mi madre, que ha sufrido y ha celebrado cada momento a mi lado, porque en la mayoría de las ocasiones vale más saber escuchar que pensar un buen consejo, este trabajo está dedicado especialmente a ella, por ser como es.

Por último quiero agradecer a la Junta de Castilla y León y al ITACyL, la concesión de una beca de especialización y posteriormente una beca predoctoral que me han permitido desarrollar el trabajo descrito en la presente memoria.



**A mis padres y hermanos  
a quienes debo todo lo que soy**



“Un buscador es alguien que busca,  
no necesariamente alguien que encuentra.  
Tampoco es alguien que necesariamente sabe  
qué es lo que está buscando, es simplemente  
alguien para quien su vida es una búsqueda.”

Jorge Bucay  
“Cuentos para pensar”



El presente trabajo ha sido realizado en el grupo de Investigación de Hongos del Departamento de Viticultura del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, gracias a la concesión de una beca predoctoral otorgada por la Junta de Castilla y León; y ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (proyecto RTA04-127) y el Plan de Experimentación Agraria de la Junta de Castilla y León

La memoria está distribuida en Capítulos, con una Introducción general, y cuatro Capítulos independientes: evolución de los decaimientos de la vid en Castilla y León, identificación molecular de los hongos asociados, variabilidad genética de *P. chlamydospora*, y medios de control. Cada Capítulo consta, a su vez, de Introducción, Materiales y métodos, Resultados y Discusión. Al final de la memoria se recogen las principales Conclusiones y la Bibliografía consultada para su desarrollo.



## RESUMEN

Los “decaimientos de la vid” son el conjunto de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos que provocan la podredumbre de la madera y consecuentemente la pérdida de vigor o incluso la muerte prematura de la planta. El propósito de este trabajo es el estudio de estas enfermedades, y sus hongos asociados, en Castilla y León. Para ello, durante los años 2003-2007, se realizó un seguimiento en 18 parcelas de vid de 6 denominaciones de origen de Castilla y León, tomando muestras de cada una de ellas para su posterior análisis en el laboratorio. En todas las denominaciones de origen estudiadas se produjo un aumento de la incidencia de estas enfermedades, pasando de un 3% de incidencia en el año 2003 a un 10% en 2007. De las plantas analizadas se aislaron e identificaron mayoritariamente: *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, Botryosphaeriaceae y *Cylindrocarpon* spp. Dentro de la familia Botryosphaeriaceae las especies aisladas mayoritariamente fueron *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Botryosphaeria dothidea* y *Neofusicoccum parvum*, mientras que *Dothiorella iberica*, *Dothiorella sarmentorum* y *Dothiorella viticola*, se aislaron esporádicamente, al igual que otras especies asociadas a los decaimientos de la vid (*Fomitiporia mediterranea*, *Phomopsis viticola*, *Eutypa lata* y *Stereum hirsutum*). La secuenciación de la región ITS del ADN ribosómico de los aislados identificados como *Cylindrocarpon* spp. puso de manifiesto la existencia de: *N. macrodidyma*, *C. liriodendri* y *C. olidum*. Teniendo en cuenta que *P. chlamydospora* fue una de las especies aisladas con mayor frecuencia, se estudió la variabilidad genética de 35 aislados de *P. chlamydospora* mediante RAPDs y por comparación de las secuencias de tres regiones del genoma: ITS,  $\beta$ -tubulina y factor de elongación 1 $\alpha$ , confirmándose la escasa variabilidad genética existente entre los aislados de esta especie. A partir de las secuencias de la región ITS se diseñó un sistema de identificación mediante RTi-PCR que permite detectar hasta 1 fg de ADN o 1 espora de *P. chlamydospora*. Simultáneamente, se realizó un estudio *in vitro* de la actividad de 3 fungicidas (Escudo<sup>®</sup>, Carbendazima y Flusilazol) sobre 14 especies de hongos asociadas a estas enfermedades observándose que en general el efecto producido es fungistático y no fungicida.





## Abreviaturas y siglas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
c-, m-, $\mu$ -, n-, p-, f-	centi-, mili-, micro-, nano-, pico-, fento-
dNTP	desoxi-ribonucleótido-trifosfato
DO	densidad óptica
DDOO	denominaciones de origen
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EtBr	bromuro de etidio
FAM	6-carboxifluoresceína
g	gramo(s)
h	hora(s)
ha	hectáreas
kb	kilobase(s)
kDa	kilodalton(s)
l	litro(s)
m	metro
M	molar
MEA	Agar extracto de malta
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
min	minuto(s)
nd	no determinado
nm	nanómetro(s)
°C	grados Celsius
pb	par(es) de bases
PDA	Agar patata dextrosa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
p/v	peso/volumen
RAPD	random amplified polymorphic DNA
Rn	fluorescencia normalizada
rpm	revoluciones por minuto
RTi-PCR	PCR a tiempo real
s	segundos
SD	desviación estándar
sp(p)	especie(s)
T	temperatura
TBE	Tris base, ácido bórico, EDTA
TE	Tris-HCl (10mM); EDTA (1mM)
Tm	temperatura de disociación
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano hidroclorehídrico
V	voltio
v/v	volumen /volumen
Vol.	Volumen
$\Delta Rn$	incremento de fluorescencia normalizada



## Índice



<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>Pág.</b>
<b>1. Los inicios de la viticultura</b>	<b>1</b>
<b>2. La viticultura y el vino en España</b>	<b>2</b>
2.1. De los inicios a la Reconquista	2
2.2. Desde la Reconquista hasta el siglo XX	3
<b>3. Importancia económica</b>	<b>4</b>
<b>4. El sector vitivinícola en Castilla y León</b>	<b>6</b>
4.1. Denominación de Origen Arlanza	6
4.2. Denominación de Origen Arribes.	7
4.3. Denominación de Origen Bierzo	7
4.4. Denominación de Origen Cigales	8
4.5. Denominación de Origen Ribera del Duero	8
4.6. Denominación de Origen Rueda	8
4.7. Denominación de Origen Tierra de León	9
4.8. Denominación de Origen Tierra del Vino de Zamora	9
4.9. Denominación de Origen Toro	10
<b>5. Principales plagas y enfermedades del viñedo</b>	<b>10</b>
5.1. Enfermedades producidas por insectos	10
5.2. Enfermedades producidas por ácaros	11
5.3. Enfermedades producidas por bacterias y levaduras	11
5.4. Enfermedades producidas por virus y fitoplasmas	11
5.5. Enfermedades producidas por hongos	12

<b>6. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid</b>	<b>13</b>
<b>6.1. Enfermedad de Petri (Petri disease, black goo)</b>	<b>13</b>
<b>6.2. Pie negro (black foot)</b>	<b>14</b>
<b>6.3. Yesca o apoplejía (esca)</b>	<b>14</b>
<b>6.4. Enfermedades asociadas a miembros de la familia Botryosphaeriaceae</b>	<b>16</b>
<b>6.5. Eutipiosis</b>	<b>17</b>
<b>6.6. Excoriosis</b>	<b>18</b>
<b>7. Hongos asociados a los decaimientos de la vid</b>	<b>19</b>
<b>7.1. <i>Phaeoacremonium</i> spp.</b>	<b>20</b>
<b>7.2. <i>Phaeomoniella chlamydospora</i></b>	<b>21</b>
<b>7.3. <i>Cylindrocarpon</i> spp.</b>	<b>22</b>
<b>7.4. Familia Botryosphaeriaceae</b>	<b>23</b>
<b>7.5. <i>Stereum hirsutum</i></b>	<b>27</b>
<b>7.6. <i>Fomitiporia mediterranea</i></b>	<b>27</b>
<b>7.7. <i>Phomopsis viticola</i></b>	<b>28</b>
<b>7.8. <i>Eutypa</i> spp.</b>	<b>29</b>
<b>8. Identificación de los hongos asociados</b>	<b>30</b>
<b>9. Estrategias de control</b>	<b>32</b>
<b>9.1. Métodos culturales</b>	<b>32</b>
<b>9.2. Métodos físicos</b>	<b>32</b>
<b>9.3. Métodos biológicos</b>	<b>32</b>
<b>9.4. Métodos químicos</b>	<b>33</b>
 <b>OBJETIVOS</b>	 <b>37</b>

## **CAPÍTULO I. EVOLUCIÓN DE LOS DECAIMIENTOS DE LA VID EN CASTILLA Y LEÓN. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS.**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>41</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>44</b>
1. Muestreo de parcelas	44
2. Procesamiento de las muestras	45
3. Identificación de hongos por métodos clásicos	46
4. Medios de cultivo	46
5. Cálculo de la tasa de crecimiento	47
<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>
1. Evolución de los decaimientos de la vid en Castilla y León (2000-2007)	48
1.1. Sintomatología tipo “Yesca” y “Eutipiosis”	48
1.2. Valoración de los síntomas en campo	49
2. Identificación de los hongos aislados	53
3. Tasa de crecimiento	54
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>

## **CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS HONGOS ASOCIADOS. ESTUDIO DE SUS RELACIONES FILOGENÉTICAS**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>61</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Inoculación de material vegetal para ensayos <i>in vitro</i>	67
2. Obtención de ADN genómico	67
2.1. extracción rápida para identificación de especies	67
2.2. extracción de ADN a partir de material vegetal inoculado	67
3. Análisis mediante PCR	67

## Índice

3.1. Amplificación con cebadores universales	67
3.2. Amplificación con cebadores específicos	68
3.2.1. Identificación específica de aislados de <i>P. chlamydospora</i>	68
3.2.2. Identificación específica de aislados de <i>P. aleophilum</i>	69
3.2.3. Identificación específica de aislados de <i>Cylindrocarpon</i> spp.	69
3.2.4. Identificación específica de aislados de <i>E. lata</i>	70
4. Electroforesis en geles de agarosa	70
5. Purificación de los fragmentos amplificados	71
6. Cuantificación de ácidos nucleicos	71
7. Secuenciación	71
8. Relaciones filogenéticas	71
9. Identificación de especies de Botryosphaeriaceae por patrones de restricción	72
10. Detección de <i>P. chlamydospora</i> y <i>P. aleophilum</i> por PCR múltiple	73
11. Detección de <i>P. chlamydospora</i> mediante PCR a tiempo real	
11.1. Aislados de <i>P. chlamydospora</i> utilizados	75
11.2. Diseño de oligonucleótidos y sonda	75
11.3. Condiciones de amplificación	76
11.4. Especificidad del sistema RTi-PCR	76
11.5. Sensibilidad del sistema	76
11.5.1. Extracción de ADN	76
11.5.2. Límite de detección a partir de ADN de <i>P. chlamydospora</i>	77
11.5.3. Cuantificación de esporas	77
11.5.4. Límite de detección a partir de esporas de <i>P. chlamydospora</i>	77

## RESULTADOS

1. Filogenia molecular de los hongos asociados a los decaimientos de la vid	78
2. Identificación de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> y <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	80
3. Identificación de aislados pertenecientes al género <i>Cylindrocarpon</i>	81
4. Identificación de aislados de <i>Eutypa lata</i>	86
5. Identificación de especies de Botryosphaeriaceae por patrones de restricción	86
6. Detección de <i>P. chlamydospora</i> mediante PCR a tiempo real	90



6.1. Diseño del sistema	90
6.2. Especificidad del sistema	91
6.3. Sensibilidad del sistema PchITS417F/495R	93
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>96</b>
 <b>CAPÍTULO III. VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA</i></b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>101</b>
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Aislamiento y conservación de hongos	104
2. Extracción de ácidos nucleicos	105
3. Análisis de patrones RAPDs	106
4. Análisis de secuencias	107
4.1. Variabilidad de <i>P. chlamydospora</i> en la región ITS	107
4.2. Variabilidad de <i>P. chlamydospora</i> en el gen de la $\beta$ -tubulina	108
4.3. Variabilidad de <i>P. chlamydospora</i> en el factor de elongación 1 $\alpha$	108
 <b>RESULTADOS</b>	
1. Análisis de patrones RAPDs	109
1.1. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPA-2	109
1.2. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPA-8	110
1.3. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPA-11	110
1.4. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPA-16	111
1.5. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPC-8	111
1.6. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPE-20	112
2. Variabilidad de <i>P. chlamydospora</i> en la región ITS	112
3. Variabilidad de <i>P. chlamydospora</i> en la $\beta$ -tubulina	114
4. Variabilidad de <i>P. chlamydospora</i> en el factor de elongación 1 $\alpha$	115

5. Análisis de la variabilidad genética de <i>P. chlamydospora</i>	116
--	-----

DISCUSIÓN	118
-----------	-----

## CAPÍTULO IV. MEDIOS DE CONTROL. ENSAYO CON FUNGICIDAS COMERCIALES

INTRODUCCIÓN	123
--------------	-----

### MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ensayo de la actividad del fungicida comercial Escudo <sup>®</sup> y sus materias activas Carbendazima y Flusilazol	126
1.1. Actividad fungicida en placa Petri	126
1.2. Actividad fungicida en sarmientos	127
2. Análisis estadístico	128
2.1. análisis de datos de los ensayos en placa	128
2.2. análisis de datos de los ensayos en placa	128

### RESULTADOS

1. Ensayo de la actividad del fungicida comercial Escudo <sup>®</sup> y sus materias activas Carbendazima y Flusilazol en placa	129
2. Efectividad del fungicida comercial Escudo <sup>®</sup> y sus materias activas Carbendazima y Flusilazol en sarmientos de vid	131

DISCUSIÓN	134
-----------	-----

### ANEXO CAPÍTULO IV. GRÁFICAS Y TABLAS

1. Ensayo de la actividad fungicida de Escudo <sup>®</sup> , Carbendazima y Flusilazol frente a hongos asociados a los decaimientos de la vid	142
2. Análisis estadístico	142
2.1. Evaluación del efecto fungicida en placa Petri	142

2.1.1. Resultados obtenidos para <i>D. seriata</i>	142
2.1.2. Resultados obtenidos para <i>D. mutila</i>	143
2.1.3. Resultados obtenidos para <i>B. dothidea</i>	143
2.1.4. Resultados obtenidos para <i>N. parvum</i>	144
2.1.5. Resultados obtenidos para <i>Do. sarmentorum</i>	144
2.1.6. Resultados obtenidos para <i>Do. iberica</i>	145
2.1.7. Resultados obtenidos para <i>Do. viticola</i>	145
2.1.8. Resultados obtenidos para <i>P. chlamydospora</i>	145
2.1.9. Resultados obtenidos para <i>P. aleophilum</i>	146
2.1.10. Resultados obtenidos <i>C. destructans</i>	146
2.1.11. Resultados obtenidos para <i>S. hirsutum</i>	147
2.1.12. Resultados obtenidos para <i>F. mediterranea</i>	147
2.1.13. Resultados obtenidos para <i>P. viticola</i>	148
2.1.14. Resultados obtenidos para <i>E. lata</i>	148
2.2. Evaluación del efecto fungicida en sarmiento	148
 <b>CONCLUSIONES</b>	 153
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	 157



## **Introducción general**



## 1. LOS INICIOS DE LA VITICULTURA

El cultivo de la vid y el vino han estado ligados a la historia de la humanidad formando parte de la cultura, el arte y la salud a lo largo de siglos, estableciendo una conexión entre el pasado, el presente y el futuro.

Según la mitología griega, tras varias batallas en Mesopotamia, Dionisos, dios del vino (Baco en Roma) recorrió la Grecia clásica, con la misión de dar a conocer a los hombres la existencia de la vid y la bendición del vino, y con ese objetivo llegó hasta las tierras de Icaria. Cuando llegó a Attica fue amablemente recibido por el rey Icario y su hija Erígone, y en agradecimiento le enseñó el cultivo de la uva y la elaboración de los vinos, con tan buen resultado que Icario logró el primer vino producido por los seres humanos. Entusiasmado por el éxito de la cosecha y el excelente sabor de sus caldos, Icario se fue por todo el reino invitando generosamente a sus súbditos a disfrutar del vino reciente. Éstos bebieron en abundancia, y al poco comenzaron a sentirse alegres al tiempo que confusos: sentían al mismo tiempo el terror del mareo creciente y la pérdida de la visión, pero su euforia y la pérdida de la consciencia también aumentaba con el vino. Pensaron entonces que habían sido envenenados por Icario por lo que mataron al rey Icario, y enterraron su cuerpo bajo un pino. Maira, la perra fiel de Icario, asistió impotente a todo el macabro proceso y, al ver al amo enterrado, corrió en busca de su hija, a quien arrastró, tirando a mordiscos de su túnica, hasta la tumba de su padre. Allí comenzó la perra con sus patas a excavar la tierra recién apilada, Erígone viendo el cuerpo de su padre, cayó en la desesperación y se ahorcó en las ramas del mismo pino que daba sombra a la descubierta tumba. Al expirar Erígone, quisieron los dioses que su misma muerte se extendiera por Atenas como aviso del crimen que había quedado sin castigo. Por esa voluntad divina, otras muchas jóvenes, sin llegar ellas mismas a saber por qué lo hacían, se quitaban la vida simultáneamente, ahorcándose sin razón conocida en muy distintos lugares de la ciudad, hasta que los dioses hicieron saber a los hombres, que Icario y su hija Erígone habían muerto por la injusticia de los campesinos, y que era necesario que la venganza cayera sobre los culpables. Para saldar la injusticia los ejecutores atenienses se dirigieron a las tierras de Icaria y dieron muerte a los que habían asesinado a su rey Icario.

La Biblia señala cómo Noé al salir del Arca tras el Diluvio, plantó una viña en la zona del monte Ararat (Armenia) convirtiéndose en el primer viticultor: “Noé que era labrador plantó viñas, y bebiendo vino se embriagó, y se desnudó en medio de su

tienda” (Génesis, 9, 20-25). Los pasajes bíblicos que hacen referencia a la vid son numerosos y siempre se asocia a la tierra fértil en la que se cultivaba.

Pocas noticias se tienen del cultivo de vid en aquellos tiempos. El más antiguo indicio de actividad vitícola se remonta hacia los 5000 años a.C. en la localidad de Chokn (Cáucaso). En Mesopotamia, tierras comprendidas entre los ríos Tigris y Eufrates, cuyos orígenes se remontan a 5000 años a.C., existen testimonios escritos sobre la presencia del vino (Hidalgo, 2002). En Egipto se producía vino desde la 4ª dinastía de los faraones (2500 a.C); los griegos y los romanos consumían vino y contribuyeron a la propagación del cultivo de la vid introduciendo este cultivo en su imperio, así como en aquellas tierras que conquistaban.

## **2. LA VITICULTURA Y EL VINO EN ESPAÑA**

### **2.1. De los inicios a la Reconquista**

No existe una clara unanimidad sobre el lugar en el que comenzaron a realizarse los primeros cultivos de vid en España y quienes fueron los que introdujeron las técnicas de elaboración del vino. Diversas fuentes apuntan que los primeros viñedos se habrían asentado en el litoral occidental andaluz constituyendo el punto de entrada y el lugar de las viñas más antiguas de España. Esta teoría parece ser la más probable, y está avalada por la presencia de los fenicios en la península hace alrededor de 3.000 años. Este pueblo comerciante fundó un puerto en el sudoeste al que llamaron Gadir (Cádiz, en la actualidad). Después se trasladó tierra adentro, creando otra ciudad llamada Xera (ahora Jerez en cuyas montañas circundantes plantaron vides. El clima cálido de la zona favoreció la naturaleza fuerte y dulce de los vinos, lo que les permitía soportar muy bien los viajes. Este hecho, unido al espíritu comerciante de los fenicios, supuso que ya en el comienzo de la era cristiana, los vinos españoles se convirtieran en una de las mercancías más comunes en los intercambios comerciales del Mediterráneo y norte de África.

Serían los romanos los que continuarían la producción de vinos en la península, para lo que incorporaron sus métodos particulares de elaboración. Entre ellos destaca la crianza en ánforas de barro situadas en estancias altas y soleadas, y cerca de chimeneas. La necesidad de abastecer al vasto imperio y sus legiones contribuyó a intensificar el ya notable tráfico comercial que habían alcanzado los vinos españoles.



El declive del Imperio Romano y la posterior invasión bárbara supuso un freno en el desarrollo de la viticultura en España. Las primeras hordas germánicas destruyeron muchas plantaciones de vid. Posteriormente, la llegada de los visigodos a la península contrarrestó la acción de los bárbaros. Más civilizados que sus predecesores, por el contacto con los romanos en las provincias limítrofes del Imperio, concedieron una gran importancia a la viticultura.

La llegada de los árabes en el siglo VIII también se tradujo en algunas dificultades para el desarrollo de la vid y la elaboración del vino debido a la prohibición coránica de consumir bebidas fermentadas y alcohólicas. Pese a ello, el cultivo de la vid continuó e, incluso, se mejoró durante el periodo de dominación musulmana. La primera causa se encuentra en la propia uva como fruta y su zumo: no había motivos para prohibir su consumo ni tampoco el del mosto sin fermentar. Por lo tanto, no se podía impedir su cultivo, al menos para los no musulmanes. La segunda causa es la conocida permisividad de algunas dinastías más liberales hacia los cristianos dominados, a los que permitieron continuar con el cultivo de sus viñedos y la elaboración del vino, sobre todo en los monasterios.

## **2.2. Desde la Reconquista hasta el siglo XX**

Sin embargo, no sería hasta después de la Reconquista por parte de los Reyes Católicos cuando se produciría el despegue definitivo de la viticultura. Las comunidades religiosas y los monasterios que se fueron restableciendo jugaron un importante papel ya que serían los monjes y frailes los que más se afanaron en recuperar la tradición vinícola. El vino era un elemento imprescindible para sus ritos religiosos, aunque no se conformaron con el necesario para su culto, sino que se encargaron también de abastecer sus bodegas para alegría de los lugareños y peregrinos. De este modo, las viñas comenzaron de nuevo a florecer alrededor de los monasterios y abadías para extenderse posteriormente a otros terrenos.

A lo largo de los siglos siguientes el vino se convirtió en un alimento esencial en la dieta de la época, a lo que se unió la posibilidad de comercializarlo en lugares distintos a los de su producción. Este desarrollo de los flujos comerciales potenció el nacimiento de las distintas regiones vinícolas y se produjo así un considerable trasiego de municipios y regiones que se turnaron en el abastecimiento de vino a la Corte.

El siglo XIX es crucial en la industria vinícola española. Aunque tímidamente, comienzan a implantarse algunas reformas que tienen como objetivo la mejora de la calidad del vino y se implantan nuevas técnicas industriales de elaboración del vino que sustituyen a las tradicionales artesanales. Por otro lado, la desgraciada llegada de la filoxera al norte de Europa, que devastó progresivamente los viñedos a mediados de siglo, contribuyó a consolidar la viticultura en España. Muchos vinateros franceses se establecieron al otro lado de los Pirineos como única forma para continuar con su medio de vida y trajeron consigo sus variedades de uva, maquinaria y métodos, entre los que destacaban la disposición de las cepas, el control de la fermentación o el sulfitado. Algunas de las plantaciones de Cabernet-Sauvignon y Merlot existentes en la actualidad en La Rioja y Ribera del Duero proceden de este tiempo. Sin embargo, a finales del siglo la plaga terminó afectando a la península. Afortunadamente, en aquel momento ya se conocía la solución para acabar con ella: injertar sobre patrón americano, más resistente a la plaga, con lo que la recuperación de las viñas y su producción resultó menos traumática que en otros países europeos.

Ya en el siglo XX, la industria vinícola tuvo que enfrentarse a dos nuevos desastres. La Guerra Civil condenó a la viña al abandono y cuando el enfrentamiento acabó, la II Guerra Mundial supuso la paralización del mercado europeo del vino. Ambos sucesos supusieron un nuevo y duro golpe para el sector, que sólo a partir de los años cincuenta empezó a recuperar la normalidad. Desde entonces, las reestructuraciones de viñedos y la renovación y modernización de los procedimientos de elaboración y bodegas han caracterizado la actuación de los viticultores y vinicultores españoles, hasta situar a los vinos de España en igualdad de condiciones competitivas que los foráneos, tanto en el mercado nacional como mundial.

### **3. IMPORTANCIA ECONÓMICA**

La Unión Europea lidera el sector vitivinícola a nivel mundial, abarcando el 47% de la superficie vitícola y el 60% de la producción de vino. Los principales productores a nivel mundial son Francia, Italia, España, Estados Unidos, Argentina y Australia, abarcando entre los tres primeros más del 50% de la producción mundial. Mientras que el sector vitivinícola en Francia e Italia ha sufrido un retroceso en los últimos 10 años, el sector español ha experimentado un fuerte empuje. Por otro lado hay que señalar que se ha ido produciendo una disminución en el consumo de vino a nivel mundial.

La Unión Europea es el primer exportador mundial, con el 70% de las exportaciones, así como el primer importador con aproximadamente el 30% de las importaciones. Italia, Francia y España acaparan el 53,8% de las exportaciones mundiales, a pesar de que en los últimos años empiezan a ser alcanzadas por los productores de los denominados países del “Nuevo Mundo” (EE.UU., Argentina, Australia, Sudáfrica y Chile).

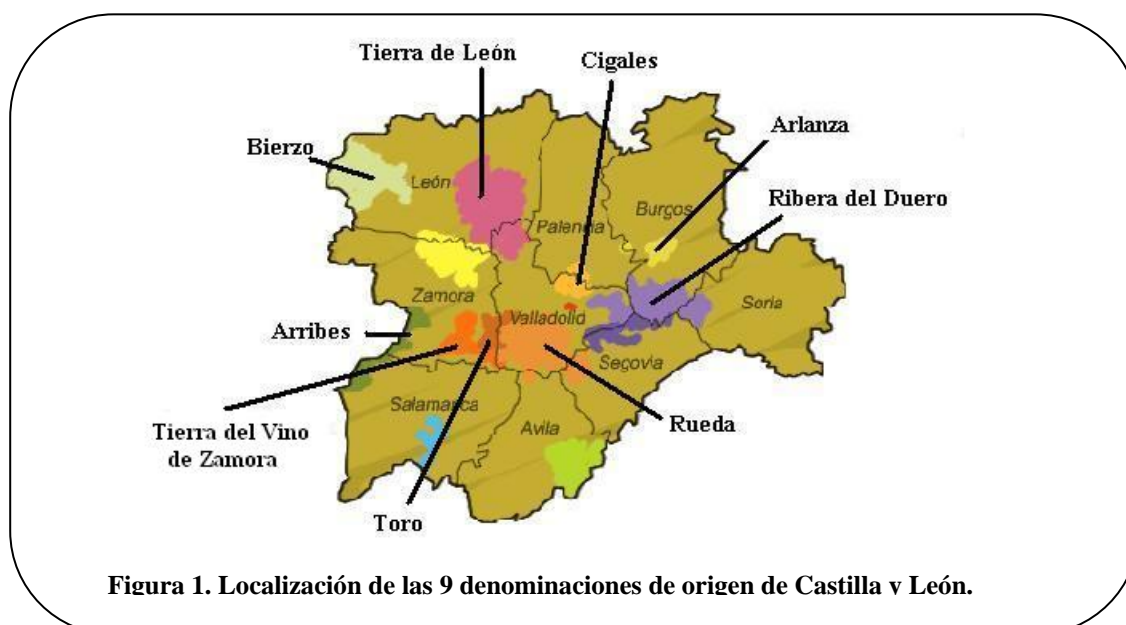
El sector vitivinícola español es de gran importancia tanto por el valor económico que genera, como por la extensión que ocupa, el papel que desempeña en la conservación medioambiental así como la buena imagen que aporta de España a nivel internacional.

España, con cerca de 1,2 millones de hectáreas destinadas al cultivo de la uva (de la que el 97,4 % se destina a vinificación, el 2% a uva de mesa, el 0,3 % a la elaboración de pasas y el 0,3 % restante a viveros), es el país con mayor extensión de viñedo de la Unión Europea y del mundo (un tercio de la superficie total de la UE, seguida por Francia e Italia con aproximadamente un 25% cada una). La vid ocupa el tercer lugar en extensión de los cultivos españoles, detrás de los cereales y el olivar. De acuerdo con los datos recogidos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V), el descenso en las superficies destinadas al cultivo de uva de vinificación que experimenta la Unión Europea queda compensado con el crecimiento experimentado en otras regiones fuera de la Unión, por lo que la superficie a nivel mundial se mantiene prácticamente estable, pasando de 7.930.000 hectáreas en 2005 a 7.924.000 en 2006.

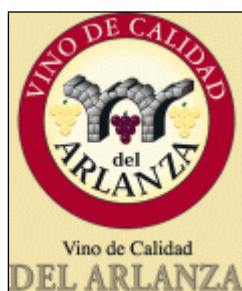
La facturación total de los 70 primeros grupos vitivinícolas españoles supera los 3.000 millones de euros, con un incremento interanual de un 3,8 %. España exportó en 2006 1.440 millones de litros de vino, por valor de 1.642 millones de euros. En términos absolutos se han facturado 61,5 millones de euros más que el año anterior, a pesar de la caída en volumen, como consecuencia del buen comportamiento de las exportaciones de los vinos de calidad (con y sin denominación de origen). Los vinos de denominación de origen envasados, han experimentado un aumento de un 8,5 %, hasta alcanzar los 798 millones de euros que equivalen al 49 % de la facturación total. También evolucionan positivamente las exportaciones de los vinos de mesa envasados, que crecen un 3,4 % hasta los 177 millones de euros.

#### 4. EL SECTOR VITIVINÍCOLA EN CASTILLA Y LEÓN

El sector vitivinícola de Castilla y León es uno de los grandes motores de la economía de la región a nivel agrícola. Castilla y León cuenta con 9 denominaciones de origen: Arlanza, Arribes, Bierzo, Cigales, Ribera del Duero, Rueda, Tierra de León, Tierra del Vino de Zamora y Toro (Figura 1). La superficie de viñedo abarca alrededor de 68250 ha. con una producción que ronda los 193 millones de kg de uva (considerando la producción acogida a denominación de origen) de la que se obtuvieron 2412446 hectolitros de vino incluyendo tanto vino de mesa como V.C.P.R.D (Vinos de Calidad Producidos en Regiones Determinadas) según datos publicados en el Anuario Estadístico de Castilla y León (año 2006).



##### 4.1. Denominación de Origen Arlanza



La denominación fue reconocida en abril de 2007 (AYG/781/2007 BOCyL 27/04/2007). Está compuesta por 67 núcleos de población, de los cuales 54 pertenecen a la provincia de Burgos, y 13 a la de Palencia. Hasta diciembre de 2006 el consejo contaba con 65 ha y doce bodegas inscritas en el registro.

La Ribera del Arlanza se sitúa en la zona centro de la provincia de Burgos, a unos 40 kilómetros de la capital hacia el sur. Situada en el valle medio y bajo del río Arlanza y de sus afluentes, hasta su confluencia con el Pisuerga al sur-este de Palencia. La zona se encuentra enclavada entre la Sierra de Covarrubias, al este, hasta los Páramos del Cerrato, al oeste.

Las variedades autorizadas por el reglamento del consejo regulador son las siguientes:

Tintas: -Variedad principal: Tinta del País (Tempranillo).

-Variedades autorizadas: Garnacha, Mencía, Cabernet Sauvignon, Merlot y Petit Verdot.

Blancas: -Variedades autorizadas: Albillo y Viura.

#### **4.2. Denominación de Origen Arribes.**



Fue creada mediante la orden AYG/1264/2007 (BOCyL nº 146, 27 de julio del 2007). La denominación de origen incluye a veinte pueblos salmantinos de las comarcas de Vitigudino y Ciudad Rodrigo y 25 del suroeste de Zamora, con una extensión de 140 kilómetros marcada por la ribera del río Duero.

La superficie cultivada de viñedo inscrita en la asociación de calidad es de 721 ha, aunque hay cerca de 3.500 ha que aún no se han incorporado a la misma; cuenta con 634 viticultores, repartidos en doce bodegas elaboradoras de las que nueve son embotelladoras.

Las variedades autorizadas por el reglamento del consejo regulador son las siguientes:

Tintas: -Variedades principales: Juan García (autéctona) Rufete y Tempranillo.

-Variedades autorizadas: Mencía y Garnacha.

Blancas: -Variedad principal: Malvasía.

-Variedades autorizadas: Verdejo y Albillo.

#### **4.3. Denominación de Origen Bierzo**



Fue reconocida como Denominación de Origen el 11 de noviembre de 1989. Se encuentra situada al Noroeste de la Provincia de León, abarcando 2.954,28 km<sup>2</sup>. Posee una superficie de viñedo inscrita de 4.274 ha y alrededor de 4.500 viticultores registrados. En la actualidad existen 48 bodegas inscritas en el registro del consejo regulador.

Las variedades autorizadas por el reglamento del consejo regulador son las siguientes:

Tintas: -Variedad principal: Mencía

-Variedades autorizadas: Garnacha Tintorera

Blancas: -Variedades principales: Doña Blanca y Godello

-Variedades autorizadas: Malvasía y Palomino.

#### 4.4. Denominación de Origen Cigales



Reconocida como Denominación de Origen el 9 de marzo de 1991, se haya enclavada en el sector norte de la depresión del Duero extendiéndose desde el término municipal de Valladolid hasta el palentino de Dueñas a ambos márgenes del río Pisuerga. Posee una superficie de viñedo inscrita de 2.650 ha. y 37 bodegas repartidas entre los distintos municipios .

Las variedades autorizadas por el reglamento del consejo regulador son las siguientes:

Tintas: -Variedad principal: Tinta del País (Tempranillo)

-Variedades autorizadas: Garnacha Tinta, Garnacha Roja

Blancas: -Variedades autorizadas: Verdejo, Albillo, Viura

#### 4.5. Denominación de Origen Ribera del Duero



Su reglamento fue aprobado el 1 de diciembre de 1992. Las tierras que se agrupan bajo la Denominación de Origen Ribera del Duero se sitúan en la confluencia de cuatro provincias integradas en la Comunidad Autónoma de Castilla y León: Burgos, Segovia, Soria y Valladolid.

El río Duero es el eje que une a más de 100 pueblos extendidos a lo largo de una franja vitícola de unos 115 km de longitud y 35 de anchura con 20.502 ha de viñedo y más de 200 bodegas registradas.

Las variedades autorizadas por el reglamento del consejo regulador son las siguientes:

Tintas: -Variedad principal: Tempranillo

-Variedades autorizadas: Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Garnacha

Tinta

Blancas: -Variedad autorizada: Albillo

#### 4.6. Denominación de Origen Rueda



La Denominación de Origen Rueda fue reconocida el día 12 de enero de 1980, siendo la primera Denominación de Origen reconocida en Castilla y León. La zona de producción está integrada por 72 municipios, de los cuales 53 se sitúan al sur de la provincia de Valladolid, 17 al oeste de Segovia y dos al norte de Ávila.

La Superficie de variedades blancas inscrita en la D.O. Rueda en enero de 2007 fue de 6.517,25 ha y cuenta con 48 bodegas acogidas a la denominación.

Las variedades autorizadas por el reglamento del consejo regulador son las siguientes:

Tintas: -Variedad principal: Tempranillo  
-Variedades autorizadas: Cabernet Sauvignon, Merlot y Garnacha.

Blancas: -Variedad principal: Verdejo  
-Variedades autorizadas: Viura, Sauvignon Blanc y Palomino.

#### 4.7. Denominación de Origen Tierra de León



Obtuvo el reconocimiento de Denominación de Origen el 27 de Julio de 2007. La mayoría de los municipios que abarca pertenecen a la provincia de León, a los que hay que añadir 19 municipios del norte de la provincia de Valladolid.

Hasta el momento no existen datos de hectáreas registradas aunque cuenta con más de 30 bodegas asociadas.

Las variedades autorizadas por el reglamento del consejo regulador son las siguientes:

Tintas: -Variedades principales: Prieto Picudo y Mencía  
-Variedades autorizadas: Tempranillo y Garnacha.

Blancas: -Variedad principal: Malvasía y Palomino.  
-Variedades autorizadas: Verdejo Albarín blanco y Godello.

#### 4.8. Denominación de Origen Tierra del Vino de Zamora



Fue creada mediante la orden AYG/782/2007 (BOCyL nº 81, 27 de abril de 2007). La Comarca de "Tierra del Vino de Zamora" se encuentra enclavada en ambas márgenes del río Duero a su paso por la provincia de Zamora, y recorrida de norte a sur por la Vía de la Plata.

Situada dentro del gran corredor del Duero, río vitícola español por excelencia, comprende una superficie de aproximadamente 1.800 Km<sup>2</sup> distribuidos entre un total de 61 localidades, de las cuales 51 pertenecen a la provincia de Zamora y 10 se encuentran en tierras de Salamanca. La superficie de viñedo inscrita en el Consejo Regulador alcanza las 790 ha.

Las variedades autorizadas por el reglamento del consejo regulador son las siguientes:

Tintas: -Variedades principales: Tempranillo  
-Variedades autorizadas: Garnacha y Cabernet Sauvignon.

Blancas: -Variedad principal: Malvasía, Moscatel de grano menudo y Verdejo.  
-Variedades autorizadas: Albillo, Palomino y Godello.

#### 4.9. Denominación de Origen Toro.



Fue reconocida como Denominación de Origen el 25 de mayo de 1987. La zona de producción de los vinos amparados por la D.O. Toro se encuentra situada al sudeste de la provincia de Zamora, y comprende parte de las comarcas naturales de Tierra del Vino, Valle del Guareña y Tierra de Toro, y linda con los páramos de Tierra del Pan y Tierra de Campos.

La superficie de viñedo registrada en el Consejo Regulador es de 5.500 ha que pertenecen a 1.200 viticultores inscritos. Comprende 12 municipios de la provincia de Zamora y 5 de Valladolid.

Las variedades autorizadas por el reglamento del consejo regulador son las siguientes:

Tintas: -Variedad principal: Tinta de Toro

-Variedades autorizadas: Garnacha.

Blancas: -Variedades autorizadas: Malvasía y Verdejo.

### 5. PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL VIÑEDO

El desarrollo de la vid, como el resto de los cultivos, se ve influenciado por distintos factores: condiciones climatológicas (temperatura, humedad), características del suelo, características de la propia planta (variedad, patrón) o labores agronómicas (tipo de poda, fertilización, riego) entre otros. El conjunto de estos factores condiciona el ataque de los diversos parásitos, y en función de ellos se debe establecer la estrategia de protección. A continuación se enumeran las principales enfermedades de la vid según el parásito que las origina (Los parásitos de la vid: estrategias de protección razonada, 1998).

#### 5.1. Enfermedades producidas por insectos.

La vid se ve atacada por numerosas especies de insectos incluidas en los órdenes Lepidópteros, Homópteros, Heterópteros, Tisanópteros, Coleópteros, Dípteros, Himenópteros e Isópteros. Dentro de los Lepidópteros destacan la **Polilla del Racimo** (*Lobesia botrana*) cuyas larvas destruyen los botones florales pudiendo ocasionar la pérdida de la cosecha y *Sparganothis pilleriana* conocido como **Piral** cuyos síntomas más notables se ponen de manifiesto en las hojas que aparecen roídas, agujereadas y pegadas por medio de sedas. Dentro del orden Homópteros podemos destacar la **Filoxera** (*Dactylosphaera vitifolii*) que ocasionó la peor plaga que ha padecido el viñedo español cuando entre 1890 y 1910 obligó a la reestructuración casi total de



nuestra viticultura al producir la muerte de gran parte de cepas francas que hizo necesario sustituirlas por viníferas injertadas sobre pies más tolerantes como las plantas americanas. El principal daño lo causa en las raíces de las vides europeas absorbiendo la savia e impidiendo que ésta llegue a la parte aérea, al mismo tiempo que facilita la putrefacción de las raicillas. Dentro del orden Coleópteros cabe destacar el **Tornillo de las cepas** (*Xylotrechus arvicola*) que perforan la madera formando galerías que interrumpen el paso de la savia debilitando la cepa.

### 5.2. Enfermedades producidas por ácaros.

Las principales patologías de la vid producidas por ácaros son la **araña amarilla común** (*Tetranychus urticae*), **araña roja** (*Panonychus ulmi*), **araña amarilla** (*Eotetranychus carpini*), **ácaro de la roña** (*Brevipalpus lewisi*), **acariosis** (*Calepitrimerus vitis*) y **eriosis** (*Eriophyes vitis*). Se caracterizan por afectar a los órganos verdes de la planta, principalmente a las hojas provocando manchas necróticas que disminuyen la capacidad fotosintética de la planta. La eriosis además puede manifestarse por la presencia de agallas ligeramente salientes en el haz de las hojas que se corresponden con depresiones en el envés tapizadas por abundante pilosidad. Las agallas son debidas a que los ácaros inyectan sustancias que provocan la hipertrofia de los pelos del envés.

### 5.3. Enfermedades producidas por bacterias y levaduras.

Entre las principales enfermedades de la vid ocasionadas por bacterias y levaduras podemos destacar: la **Necrosis bacteriana** (*Xylophilus ampelinus*) que afecta a yemas, sarmientos, hojas y racimos pudiendo ocasionar la muerte de la planta en pocos años, al ir dejando de brotar los distintos pulgares según avanza la enfermedad; los **Tumores de la vid** (*Agrobacterium* spp.) que provoca tumores en tronco, raíz y sarmientos aunque es una enfermedad de escasa importancia en España; la **Enfermedad de Pierce** causada por *Xylella fastidiosa*, que a pesar de ser una enfermedad muy importante en EE.UU. aún no ha sido detectada en Europa; y la **Podredumbre ácida del racimo** ocasionada por las levaduras *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* y *Pichia membranaefaciens* principalmente y como bacteria acética más frecuente *Gluconobacter* spp. que provocan la descomposición de las bayas afectadas.

### 5.4. Enfermedades producidas por virus y fitoplasmas.

Por virosis se entiende tanto las enfermedades producidas por virus, como otras enfermedades cuya causa son otros agentes patógenos tales como fitoplasmas, rickettsias, viroides, etc. Así como aquellas afecciones cuya causa es desconocida pero

que son transmisibles mediante injerto. La mayor dificultad en la erradicación de estos patógenos estriba en la imposibilidad de combatirlos mediante tratamientos fitosanitarios convencionales, por lo que su control se basa en la eliminación de las cepas afectadas y la lucha contra los vectores de transmisión. Las virosis de mayor incidencia en España son: el **Entrenudo corto infeccioso**, causado por un nepovirus caracterizándose por entrenudos cortos, con nudos dobles y aplastamiento de la madera, en hojas el seno peciolar está más abierto, las denticiones son más acusadas y se produce amarilleamiento nerviacional; el **Enrollado**, causado por un closterovirus, se caracteriza principalmente por el enrollamiento de las hojas según tres ejes, pudiendo llegar a secarse; el **Jaspeado**, causado por un virus isométrico, se manifiesta principalmente en las hojas que presentan una decoloración de los nervios y un clareamiento en las zonas adyacentes detectable al trasluz; y la **Madera rizada**, ocasionada por un vitivirus, que produce acanaladuras y pocillos bajo la corteza pudiendo apreciarse una acusada diferencia de diámetro entre el patrón y el injerto.

### 5.5. Enfermedades producidas por hongos.

A parte de las enfermedades de la madera objeto de este trabajo y que serán tratadas en el punto 6 de esta introducción general, existen enfermedades causadas por hongos que afectan a otras zonas de la vid como hojas y frutos. Entre las más importantes podemos destacar:

**-Mildiu** producida por *Plasmopara viticola* (Berl. y de Toni), se caracteriza por “manchas de aceite” en el haz de la hoja que se corresponden con una pelusilla blanquecina en el envés; en racimo se caracteriza por oscurecimiento y curvatura con posterior recubrimiento de pelusilla blanquecina si existe humedad. Los factores climáticos tienen una influencia determinante sobre el desarrollo del hongo.

**-Oídio** producida por *Uncinula necator* (Burr.) puede atacar a todos los órganos verdes de la planta. En hoja se caracteriza por un polvillo blanco ceniciento debajo del cual se pueden apreciar puntitos necrosados. En racimos al principio los granitos aparecen con un tinte plomizo que con el tiempo se recubre con polvillo ceniciento bajo el que pueden apreciarse puntitos pardos sobre el hollejo.

**-Podredumbre gris** producida por *Botrytis cinerea* (Pers.) puede atacar a todos los órganos verdes de la cepa aunque principalmente afecta a racimos, caracterizándose por manchas achocolatadas en el raspón y moho de color grisáceo sobre los granos.

Los medios de protección existentes incluyen métodos culturales, biológicos y químicos.

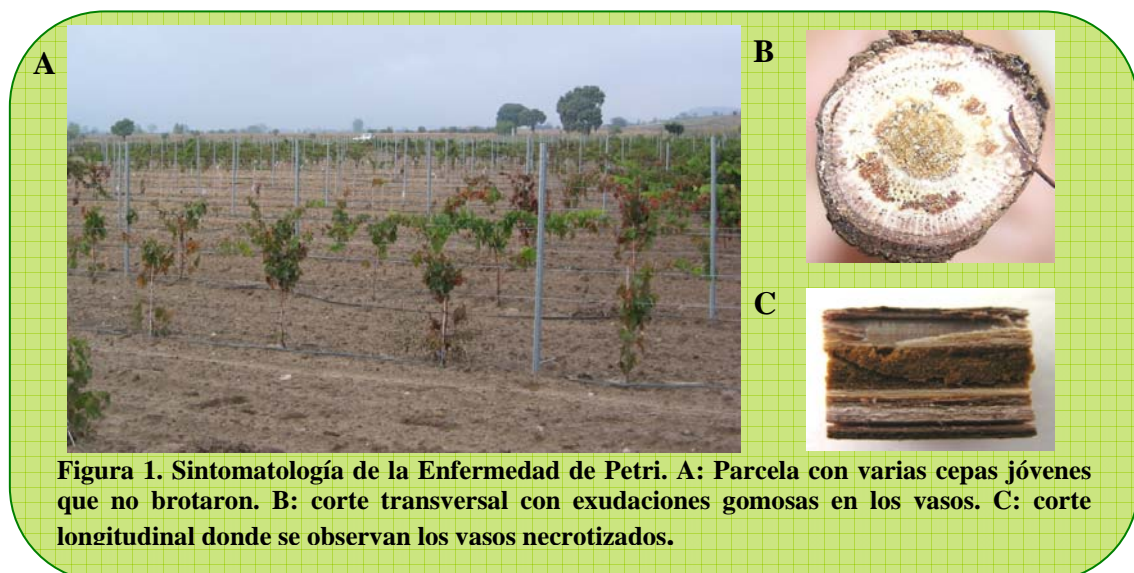
## 6. ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA MADERA DE LA VID.

Los “decaimientos de la vid” engloban varias enfermedades producidas por hongos que afectan a la madera de la vid provocando en ella diferentes sintomatologías que desencadenan una pérdida de vigor de la planta que provocará la consecuente pérdida de producción, llegando en algunos casos incluso a provocar su muerte. Uno de los principales problemas al que nos enfrentamos a la hora de realizar el seguimiento de las enfermedades de la madera en campo es la erraticidad en la aparición de los síntomas. Las plantas infectadas pueden desarrollar los síntomas o no, en función de varios factores, entre ellos las condiciones climáticas, principalmente humedad y temperatura.

### 6.1. Enfermedad de Petri (Petri disease, black goo).

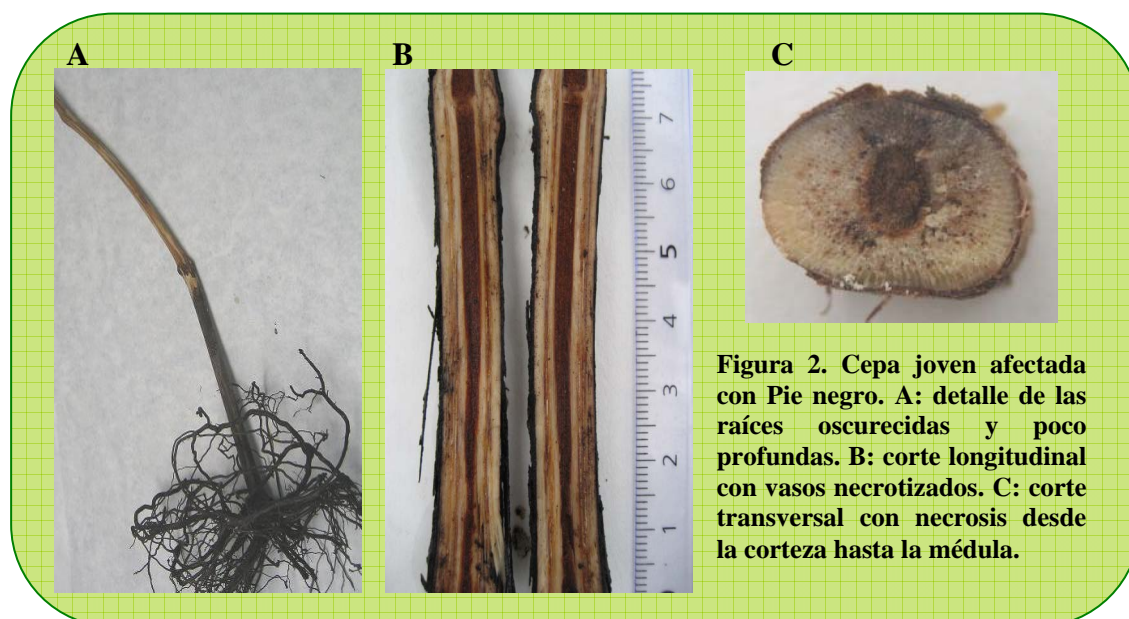
Descrita por el investigador italiano Lionello Petri en 1912, afecta principalmente a cepas jóvenes y causa importantes pérdidas económicas en las nuevas plantaciones (Bertelli y col., 1998). Los hongos descritos como agentes causales de la enfermedad de Petri son *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora*. Se considera que la enfermedad de Petri puede ser precursora de la yesca.

Se caracteriza por un crecimiento débil y lento, con brotaciones raquílicas, menor calibre en el tronco, hojas pequeñas y cloróticas y agostamiento prematuro (Figura 1A). Se produce una reducción de la biomasa radicular lo que provoca que las plantas afectadas mueran tempranamente. Al efectuar cortes transversales se observan coloraciones oscuras, generalmente en forma de anillo, en los elementos vasculares (Figura 1B), que con el tiempo suelen emitir una exudación gomosa de color negro que actúa de mecanismo de defensa frente a la invasión de hongos. En los cortes longitudinales se observan vasos necrotizados adyacentes a la médula (Figura 1C).



## 6.2. Pie negro (black foot).

Fue detectada por primera vez en Francia en 1961 y afecta a plantas jóvenes de entre 2-10 (Petit y Gubler, 2005) y ha sido descrita en la mayoría de las regiones vitícolas mundiales (Halleen y col. 2006). Se asocia a distintas especies del género *Cylindrocarpon*, en España principalmente a *C. macrodidymum* y *C. liriodendri* (Alaniz y col., 2007). Se caracteriza porque las plantas presentan escaso vigor, con tallos de pequeño grosor, acortamiento de entrenudos, follaje escaso y hojas pequeñas con clorosis internerviales y necrosis (García Jiménez, 2004). En la parte subterránea de la planta suelen observarse dos niveles radiculares. En el primer nivel, las raíces parecen normales repartidas uniformemente y en general son poco profundas (Figura 2A); en el segundo nivel, las raíces suelen estar necrosadas. En cortes longitudinales pueden observarse oscurecimiento de los vasos xilemáticos (Figura 2B); en cortes transversales se pueden observar necrosis que se desarrollan desde la periferia a la médula del portainjerto (Halleen y col. 2004). En algunos casos la diferenciación entre enfermedad de Petri y Pie Negro resulta difícil, encontrándose infecciones conjuntas.



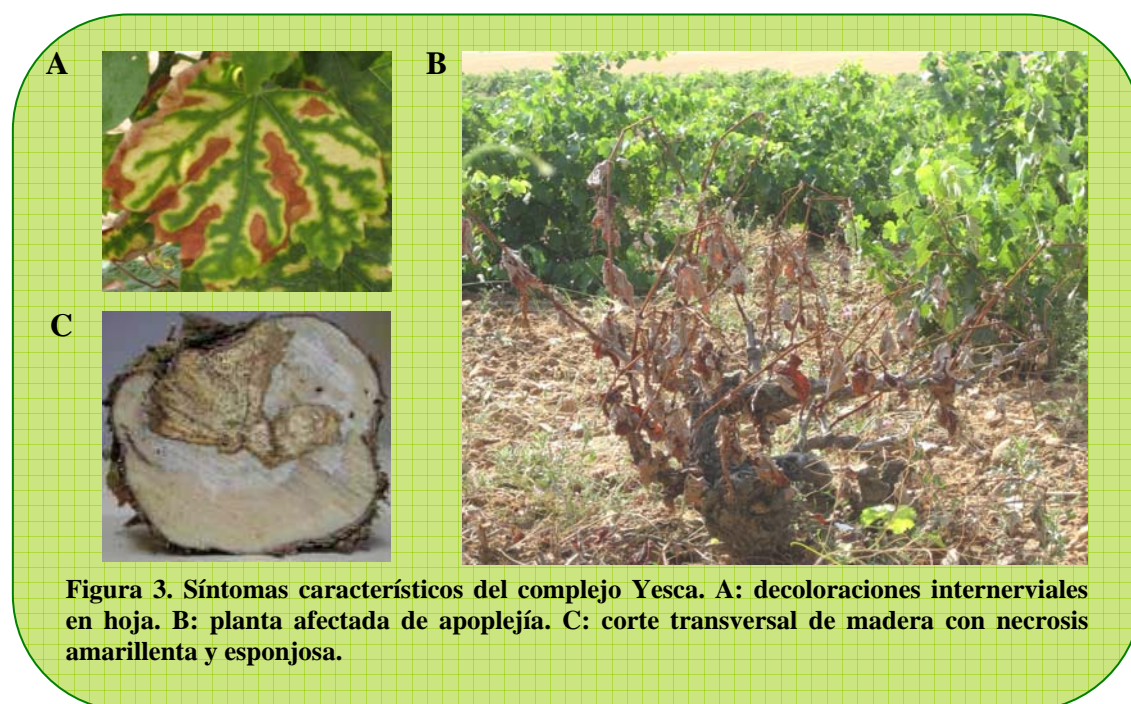
**Figura 2. Ceba joven afectada con Pie negro. A: detalle de las raíces oscurecidas y poco profundas. B: corte longitudinal con vasos necrotizados. C: corte transversal con necrosis desde la corteza hasta la médula.**

## 6.3. Yesca o apoplejía (esca).

Es una de las enfermedades de la vid más antiguas que se conocen, y se considera endémica en casi todas las zonas vitivinícolas mundiales afectando principalmente a cepas de más de 25 años (Surico y col., 2006). En los últimos años ha experimentado un gran aumento posiblemente debido a diversas causas entre las que podemos destacar la prohibición del uso del arsenito sódico, nuevas técnicas de producción del material vegetal en los invernaderos, la introducción de nuevas

variedades, empleo de nuevas técnicas culturales y el cambio climático, particularmente por la variación en las precipitaciones (Surico y col., 2006).

Se caracteriza por presentar decoloraciones y necrosis internerviales de color amarillento o pardo en las variedades de uva blanca y de un color rojizo en las tintas (Figura 3A). Esta sintomatología comienza afectando a las hojas basales y se va extendiendo al resto de la planta. La producción se reduce y los racimos pueden llegar a pasificarse. Es más frecuente y puede afectar a la vegetación de uno o varios brazos de cepas generalmente aisladas. Los síntomas aparecen después de la floración, principalmente durante el verano. El síndrome de apoplejía (desarrollo rápido de la enfermedad) suele darse en climas cálidos y en pleno verano, cuando a días tormentosos o de cielo nublado suceden otros despejados y con altas temperaturas. Las plantas, generalmente sin ningún tipo de síntomas hasta entonces, se marchitan, la vegetación de la cepa toma una coloración verde grisácea y acaba secándose parcial o totalmente en unos pocos días, comenzando por las hojas de los extremos de los sarmientos (Figura 3B). En los cortes transversales de la madera de brazos y troncos afectados aparecen zonas necrosadas de color oscuro que posteriormente se agrandan, amarillean en el centro y conservan un tono oscuro en el borde, luego los tejidos que se encuentran en el centro se desorganizan y se tornan blandos y esponjosos (Figura 3C).



Aún no se ha esclarecido si es un complejo de enfermedades o una misma enfermedad que adquiere distintas sintomatologías en función del hongo predominante o la edad de la planta. En base a ello podemos hablar de Yesca joven cuando afecta a



cepas jóvenes y los hongos asociados son *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora*, presentando síntomas característicos en hojas y pequeñas necrosis de la madera, o Yesca propiamente dicha cuando además de los síntomas mencionados aparecen pudriciones esponjosas en la madera ocasionadas por *F. mediterranea*, y en algunos casos por *Stereum hirsutum* (Surico y col., 2006).

### 6.4. Enfermedades asociadas a miembros de la familia Botryosphaeriaceae

**Black Dead Arm:** Fue descrita por primera vez en 1974 en Hungría, en la región de Tokaj. Un aumento de la enfermedad se ha asociado con los cambios de sistemas de conducción, como un cambio de vides en formas libres a vides emparradas (Lehoczky, 1996). Los síntomas aparecen a finales de Mayo en las hojas basales de la planta (Figura 4A), las cepas se caracterizan por la existencia de necrosis superficiales de color marrón en brazos y tronco, que pueden observarse al levantar la corteza. Esta necrosis longitudinales puede llegar hasta el punto del injerto (Figura 4B). En una sección transversal de la madera, el tejido afectado muestra una decoloración característica sectorial de color negro, llegando a veces hasta la médula (Figura 4C). El patógeno se desarrolla en los elementos vasculares, así como en las células adyacentes. En las grietas naturales de la corteza exterior se forman numerosos picnidios negros bien individualmente o en grupos. Los síntomas en hojas son similares a los desarrollados en plantas con Yesca, aunque en este caso las hojas nunca muestran decoloraciones amarillentas (Larignon y col., 2001) (Figura 4D).

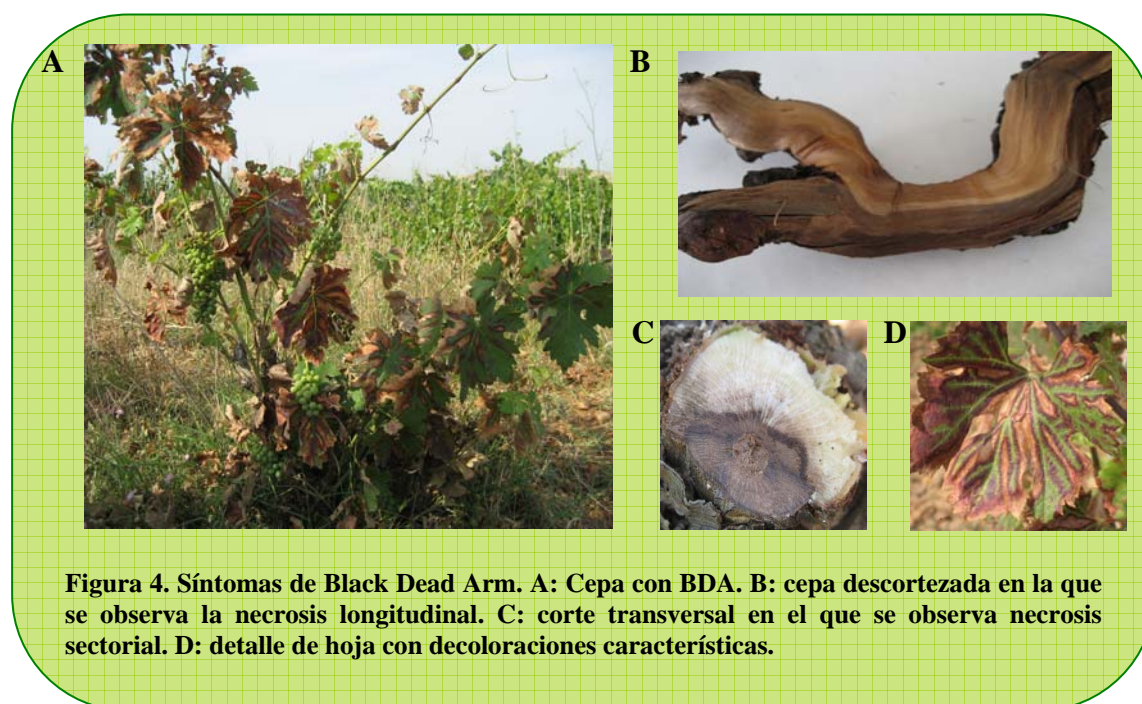
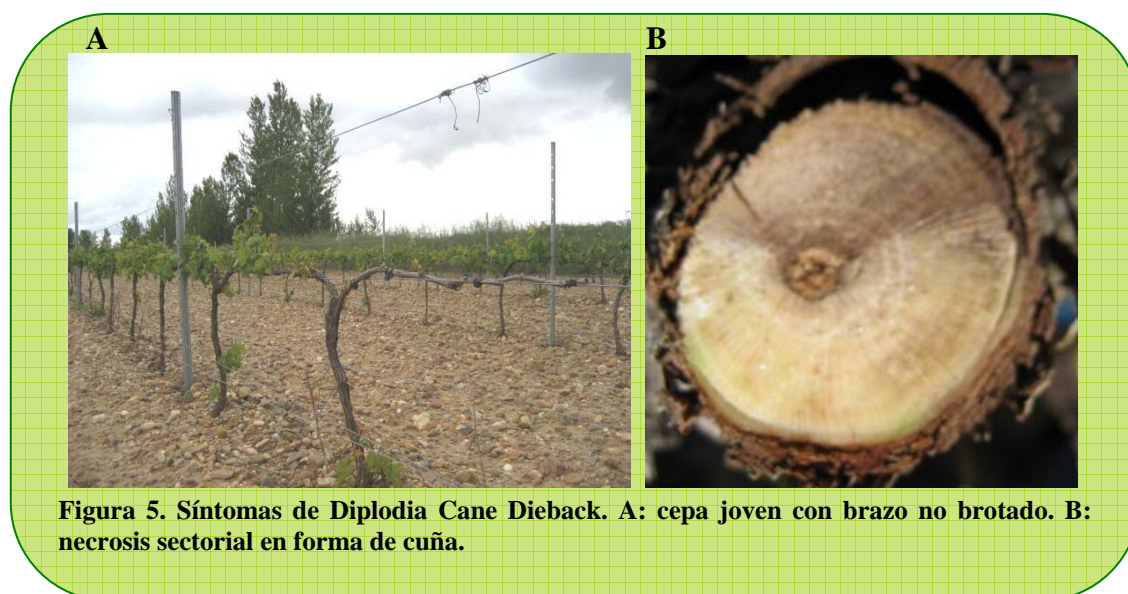


Figura 4. Síntomas de Black Dead Arm. A: Cepa con BDA. B: cepa descortezada en la que se observa la necrosis longitudinal. C: corte transversal en el que se observa necrosis sectorial. D: detalle de hoja con decoloraciones características.

Los síntomas en hojas se pueden confundir fácilmente con los de Yesca lo que ha provocado cierta controversia entre los distintos grupos que se dedican al estudio de ambas enfermedades sobre si constituye una enfermedad en sí misma, o es una variante de Yesca en la que intervienen distintas especies de Botryosphaeriaceae, principalmente *Diplodia seriata* y *Diplodia mutila* (Van Niekerk y col., 2006).

Diplodia Cane Dieback: se ha descrito principalmente en climas subtropicales o semidesérticos. El agente causal es *Diplodia rhodina*. El secado por *Diplodia* destruye los sarmientos, pulgares, brazos y madera del tronco. En su forma lenta se caracteriza por brazos de poco vigor con hojas cloróticas más pequeñas que las sanas. En la forma rápida, se secan las yemas, esto se observa en casos de desequilibrio hídrico (Figura 5A). En otoño, invierno y primavera los picnidios negros aparecen en la corteza de los sarmientos enfermos y pulgares y bajo la corteza de los chancros en brazos y troncos (Hewitt, 1996). En cortes transversales, zonas de madera grisácea se extienden desde el exterior del tronco hacia la médula, y pueden llegar a formar necrosis sectoriales como la Eutipiosis por lo que puede confundirse con ésta (Dubos, 2002) (Figura 5B).



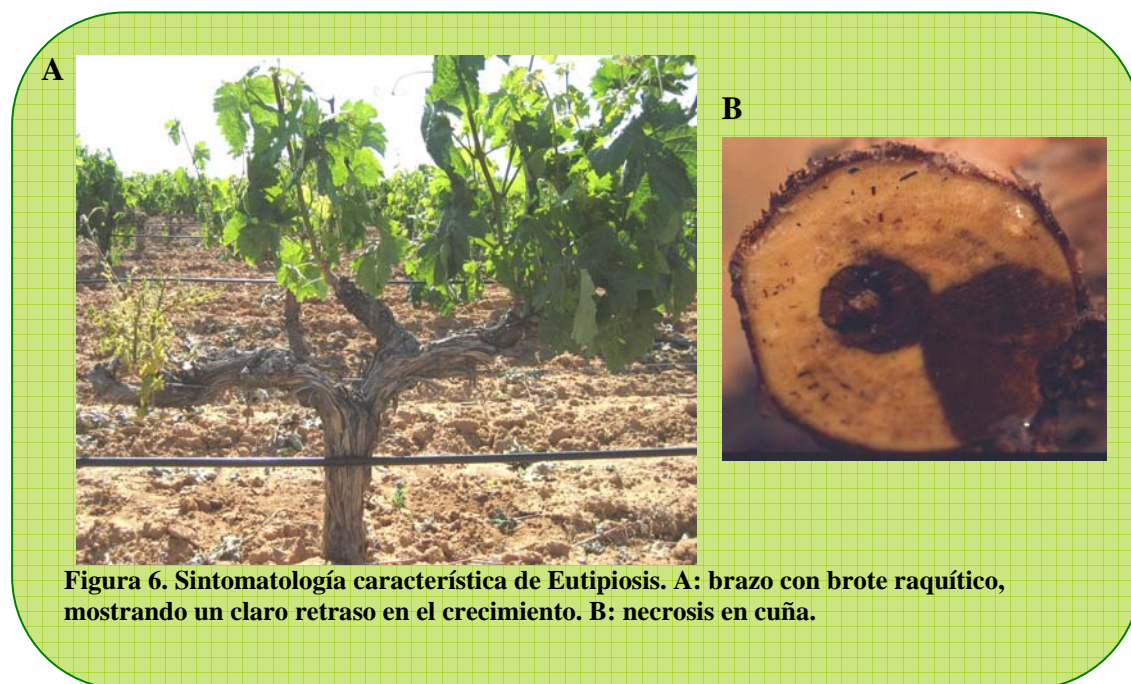
**Figura 5. Síntomas de Diplodia Cane Dieback. A: cepa joven con brazo no brotado. B: necrosis sectorial en forma de cuña.**

### 6.5. Eutipiosis.

En España se diagnosticó por primera vez en vid en 1979 en Tierra de Barros (Badajoz). El organismo causal es *Eutypa lata*, un ascomyceto de distribución mundial (Lecomte y col., 2000). Los inviernos y primaveras lluviosas son favorables para la expansión de la enfermedad. Los síntomas externos se hacen evidentes en los estadios E y F desde finales de mayo a junio. Produce pámpanos débiles, con entrenudos cortos y hojas pequeñas, deformadas y cloróticas (Figura 6A). La madera atacada toma un color marrón más o menos oscuro, claramente diferenciado del blanco pajizo de la sana, y se

torna dura y quebradiza (Figura 6B). Estos síntomas se inician en una o varias heridas y descienden en forma de cuña, siendo visibles al exterior si se eliminan las cortezas (Arias Giralda, 1998). Es debido a la presencia de chancros en forma de cuña por lo que en ocasiones puede confundirse con las enfermedades producidas por especies de la familia Botryosphaeriaceae.

Uno de los problemas que se plantea en el estudio de la Eutipiosis es el lento desarrollo de la enfermedad, ya que pueden pasar años desde que se produce la infección hasta que se manifiestan los primeros síntomas, y además, los daños aparecen a cierta distancia de la zona de infección debido a la acción de una toxina producida por el hongo: la eutipina (Perós y Berger, 1994)



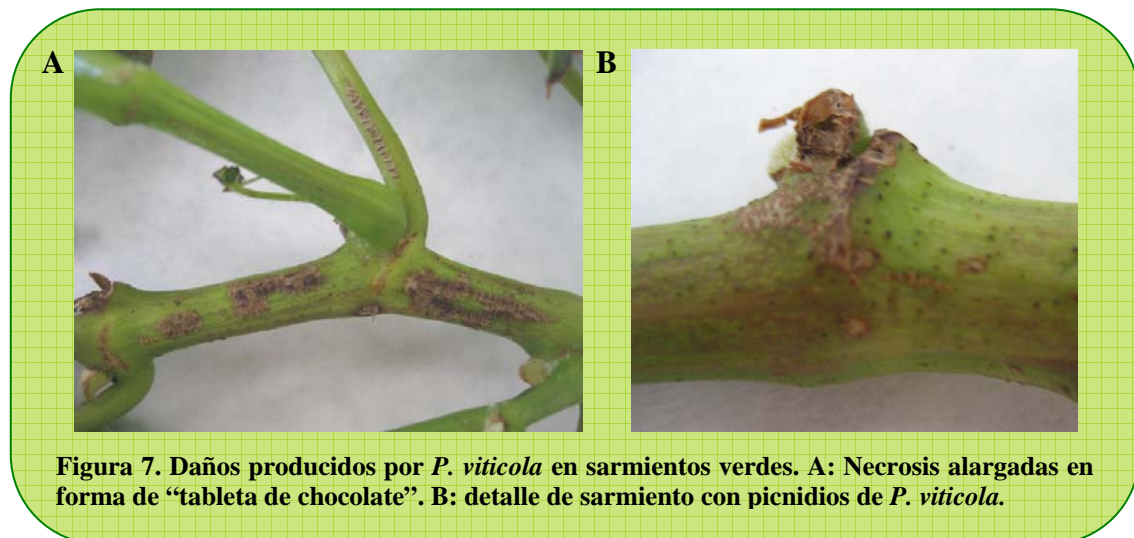
**Figura 6. Sintomatología característica de Eutipiosis. A: brazo con brote raquítico, mostrando un claro retraso en el crecimiento. B: necrosis en cuña.**

### 6.6. Excoriosis.

La excoriosis, causada por *Phomopsis viticola*, afecta a la mayoría de las zonas vitícolas mundiales, aunque los daños son mayores en las zonas donde las primaveras son lluviosas. El hongo se conserva durante el invierno en los picnidios que se encuentran en la madera y las yemas. Cuando se producen las lluvias, se liberan las esporas, las cuales infectan las cepas en estado de desborre (es la principal vía de propagación del hongo). El micelio se desarrolla en la superficie de los brotes jóvenes, avanzando con el crecimiento de los mismos cualesquiera que sean las condiciones climáticas (Pérez Marín, 2004). La excoriosis puede afectar a todos los órganos verdes de la vid, siendo su sintomatología parecida, pero los daños que ocasiona en cada uno de ellos son diferentes. En los sarmientos se observan manchas alargadas de color negro



que evolucionan rápidamente para dar en verano necrosis marrones alargadas y poco profundas. Con el tiempo, estas manchas se vuelven negras y se agrietan. Durante el verano según se lignifican los brotes herbáceos, las áreas necrosadas que rodean a las grietas se cuarteán y su perímetro toma un color blancuzco. Estas zonas poseen numerosos picnidios negros. A medida que se van lignificando los sarmientos se hacen débiles y quebradizos, siendo frecuentes las roturas, especialmente en las zonas de los estrangulamientos que produce la enfermedad (Dubos, 2002).



**Figura 7. Daños producidos por *P. viticola* en sarmientos verdes. A: Necrosis alargadas en forma de “tableta de chocolate”. B: detalle de sarmiento con picnidios de *P. viticola*.**

## 7. HONGOS ASOCIADOS A LOS DECAIMIENTOS DE LA VID

Se hacen responsables de estas enfermedades a una serie de hongos que se desarrollan preferentemente en las células del xilema o cerca de ellas, obstruyendo los vasos e impidiendo una correcta circulación de la savia.

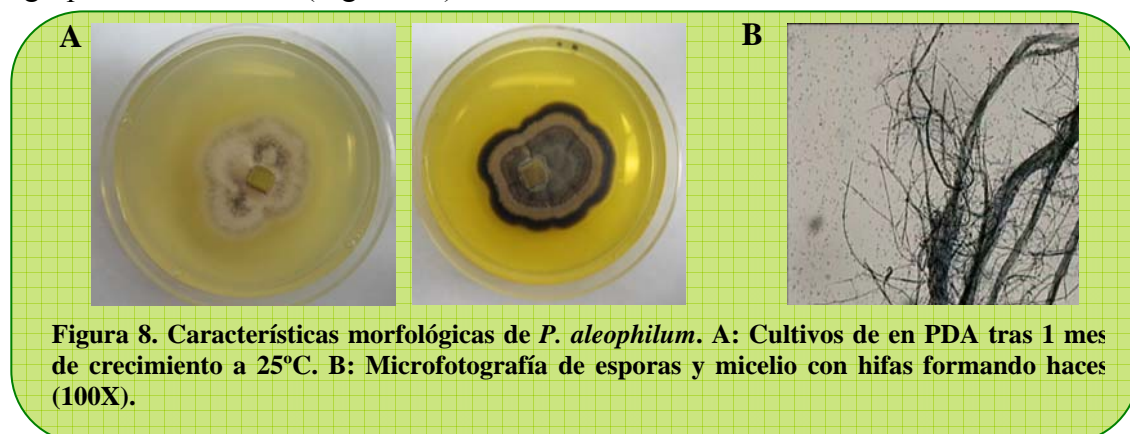
Existe una gran controversia a cerca de los hongos implicados en cada una de éstas enfermedades. Bernadette Dubos en su libro "Maladies cryptogamiques de la vigne" (2002) relaciona una enfermedad con los síntomas morfológicos y uno o varios hongos. Otros autores cuando publican los resultados de los hongos aislados de plantas con síntomas de decaimiento de la vid no llegan a relaciones tan claras entre síntomas y hongos asociados (Armengol y col. 2001, Santiago y col., 2004). Como ejemplo podemos señalar que a partir de brazos con síntomas de Eutipiosis también se han aislado *Phaeoacremonium aleophilum*, *Botryosphaeria* spp., *Phomopsis viticola*, *Phaeomoniella chlamydospora* y otros hongos. Es posible que varios hongos produzcan en la planta los mismos trastornos como la obstrucción de los vasos, y que en las plantas debilitadas no puedan defenderse ante la invasión de nuevos patógenos.

De las investigaciones realizadas en distintos países se desprende que los hongos generalmente aceptados como asociados a los decaimientos de la vid son *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phomopsis viticola*, *Stereum hirsutum*, *Fomitiporia mediterranea* y *Neofusicoccum parvum* en cuanto a especies se refiere y los géneros *Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Botryosphaeria* spp., *Cylindrocarpon* spp., *Phaeoacremonium* spp. y *Eutypa* spp.

### **7.1 *Phaeoacremonium* spp.**

El género *Phaeoacremonium* (Crous y col., 1996) pertenece a los Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Sordariomycetes incertae sedis; Calosphaeriales; Calosphaeriaceae; mitosporic Calosphaeriaceae. En un principio Dubos y Larignon (1988) a partir de cepas con síntomas de yesca aislaron *S. hirsutum* y *F. mediterranea* junto con un conjunto de hongos que denominaron *Cephalosporium*-like especies. Posteriormente estudios moleculares demostraron que los hongos aislados, que en un principio habían sido incluidos en el género *Cephalosporium*, formaban un grupo lo suficientemente diferenciado como para constituir un nuevo género que denominaron *Phaeoacremonium* y que incluía seis especies patógenas de vid: *P. aleophilum*, *P. angustius*, *P. chlamydosporum*, *P. inflatipes*, *P. parasiticum* y *P. rubrigenum*. Estudios recientes describen una nueva especie *P. viticola* (Dupont y col., 2000).

La principal especie descrita como patógena de vid en Castilla y León es *P. aleophilum* (W. Gams, Crous, M.J Wingf y L. Mugnai.). Posee un micelio de color gris ocre aceitunado, aunque adopta distintas morfologías y tonalidades. En general este hongo tiñe de amarillo ocre el medio de cultivo PDA (Figura 8A). Se caracteriza por presentar conidióforos simples o ramificados, a veces pigmentados como lo suelen estar las células basales. Su teleomorfo es *Togninia minima* (Tul. & C. Tul.) Berl. Las esporas asexuales se producen en cabezas mucosas y tiene una forma más o menos cilíndrica de 3,5-6,0 µm de longitud y 1,5-2,5 µm de anchura, sus hifas forman agrupaciones en haces (Figura 8B).

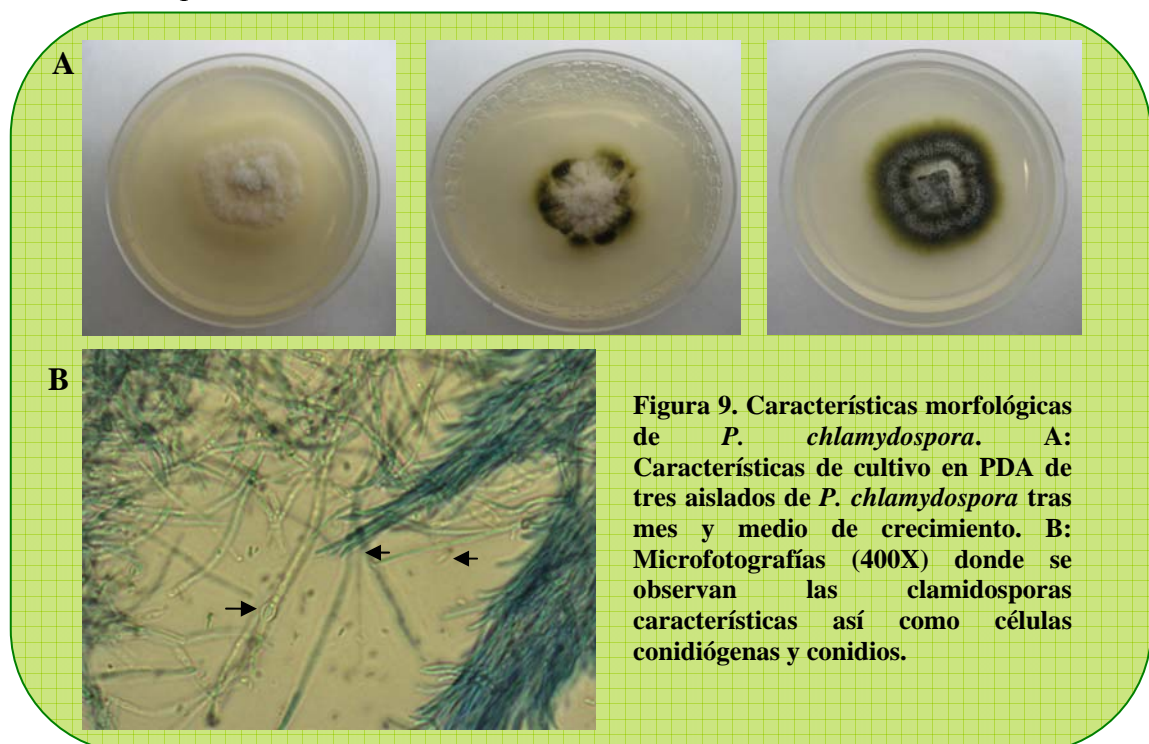


Su transmisión se realiza por madera infectada y suelo, habiéndose comprobado que también tiene una diseminación aérea, aunque al producirse ésta en el periodo vegetativo y no durante el invierno que es cuando hay heridas de poda, desde un punto de vista práctico este tipo de diseminación aérea parece no tener gran importancia.

### 7.2 *Phaeomoniella chlamydospora* (Crous y Gams)

Aislado por vez primera en 1959, de vides con síntomas de Yesca, Chiarappa le clasificó como *Cephalosporium*. *Phaeomoniella chlamydospora* pertenece a los Ascomycota; mitosporic Ascomycota y fue descrito por Crous y Gams (2000). Hasta ese momento formaba parte del género *Phaeoacremonium* considerándosele como *Phaeoacremonium chlamydosporum*. Trabajos basados en las secuencias de la región ITS, así como en características morfológicas llevaron a Crous y Gams (2000) a considerar que las diferencias existentes entre este hongo y los miembros del género *Phaeoacremonium* eran suficientes como para considerarlo un nuevo género.

No se conoce su teleomorfo. Como reproducción asexual presenta conidios algo elipsoides de 3-4 µm de longitud y 1-1,5 µm de anchura, producidos en conidióforos libres. En cultivos de más de un mes en las hifas se diferencian células que se recubren de una pared gruesa formando las clamidosporas características de la especie. El micelio es de un color verde más o menos claro con un borde blanco. Al igual que *P. aleophilum* se transmite por madera infectada y suelo, aunque, a diferencia de aquél, su diseminación aérea se produce durante todo el año, por lo que puede penetrar por las heridas de la poda, entre otras vías.



**Figura 9. Características morfológicas de *P. chlamydospora*. A: Características de cultivo en PDA de tres aislados de *P. chlamydospora* tras mes y medio de crecimiento. B: Microfotografías (400X) donde se observan las clamidosporas características así como células conidiógenas y conidios.**

### **7.3 *Cylindrocarpon* spp.**

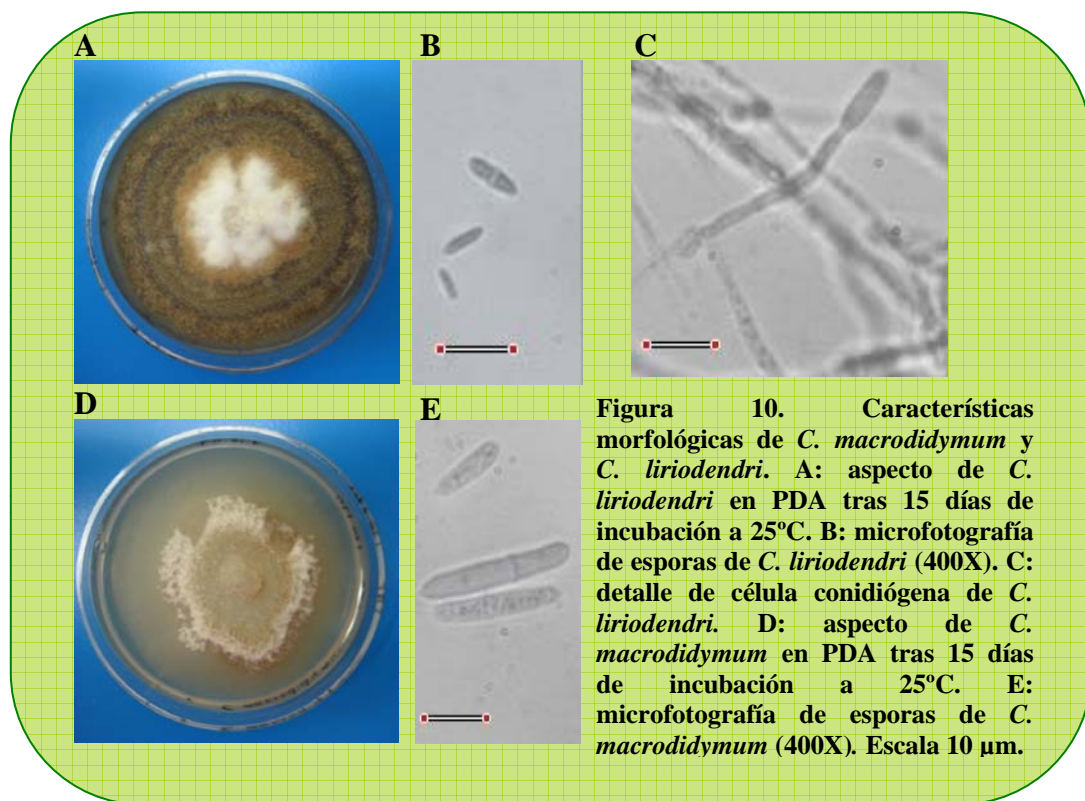
El género *Cylindrocarpon* pertenece a los Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae; Neonectria. Tradicionalmente dos han sido las especies asociadas al Pie Negro de la vid: *Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeister) Scholten y *Cylindrocarpon obtusisporium* (Cooke y Harlness) Wollenweb. *C. destructans* (teleomorfo *Neonectria radiculicola*) fue descrito por primera vez en Francia en 1961, como hongo asociado a la enfermedad del Pie Negro de la vid y posteriormente identificado en Italia, Portugal, Argentina, Alemania, Nueva Zelanda, Sur África y Brasil. *Cylindrocarpon obtusisporium* (teleomorfo *Neonectria tawa*) fue descrito como causante de esta enfermedad en Sicilia y California.

En 2004, Halleen y colaboradores, describieron una nueva especie *C. macrodidymum* (Halleen, Schroers y Crous). Estudios taxonómicos revelaron que había una escasa variabilidad genética entre los aislados identificados como *C. macrodidymum*, mientras que existía una gran variabilidad entre los aislados identificados como *C. destructans*, indicando que *C. destructans* representaba a un conjunto formado por varias especies. Los aislados de *C. destructans* habían sido obtenidos de varios huéspedes herbáceos y leñosos. Estudios posteriores pusieron de manifiesto la existencia de un subgrupo de aislados procedentes de vid, cuya secuencia era idéntica a *C. liriodendri* por lo que los aislados inicialmente descritos como *C. destructans* que habían sido aislados de vid se reclasificaron con el nombre *C. liriodendri* (teleomorfo *Neonectria liriodendri*), y *Neonectria liriodendri* pasó a considerarse el principal agente causal de la enfermedad del Pie Negro de la vid (Halleen y col., 2006). Investigaciones recientes llevadas a cabo por Alaniz y colaboradores (2007) han revelado que las especies de *Cylindrocarpon* implicadas en el pie Negro en España son *C. macrodidymum* (*N. macrodidyma*) y *C. liriodendri* (*N. liriodendri*).

*N. macrodidyma* (Halleen, Schroers & Crous) presenta peritecios *in vitro* (no se conocen en la naturaleza) solitarios o en grupos. Las ascas son estrechas en la base, cilíndricas en el extremo y contienen 8 ascosporas elipsoides. Cada ascospora está formada por dos células idénticas. Los conidióforos presentan micro y macroconidios. Los macroconidios son predominantes, son cilíndricos y pueden presentar de 1-3 (-4) septos, Los macroconidios de 1,2 y 3 septos poseen similar tamaño, macroconidias con 3 septos: (26-)34-36-38(-45) x (4-)5,5-6-6,5(-8) µm (n=116). Los microconidios son

subcilíndricos u ovoides y no suelen estar septados  $(5,5-8-9,5-10,5(-12,5) \times (3,5-4(-4,5) \mu\text{m}$  (n=43) (Halleen y col., 2004).

*N. liriodendri* (Halleen, Rego & Crous) presenta peritecios *in vitro* (no se conocen en la naturaleza) solitarios o en grupos de hasta 6 que se desarrollan directamente sobre la superficie del agar. Las ascas son estrechas en la base, cilíndricas en el extremo y contienen 8 ascosporas septadas. Los conidióforos presentan micro y macroconidios. Los macroconidios son predominantes, son cilíndricos y pueden presentar de 1-3 septos,  $(24-35-40(-55) \times (4,5-5,5-6(-6,5) \mu\text{m}$  (n=116). Los microconidios son subcilíndricos u ovoides y no suelen estar septados  $3-5 \times 3-4$ . (Halleen y col., 2006).



#### 7.4 Familia Botryosphaeriaceae

El género *Botryosphaeria* pertenece a los Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis; Botryosphaeriaceae; mitosporic Botryosphaeriaceae. Fue introducido en 1863 por Cesati y De Novaris, y revisado por Saccardo (1877) tomando como especie representativa del género a *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. Este género abarca una gran cantidad de especies con una distribución cosmopolita (Denman y col., 2000), y son causantes de decaimientos en numerosos huéspedes leñosos (Von Arx, 1987). Theissen y Sydow (1915) incluyeron *Botryosphaeria* en la sub-familia Botryosphaeriaceae, dentro de la

familia *Pseudosphaeriaceae*. La familia *Pseudosphaeriaceae* fue incluida en el orden *Myriangiales* (Theissen, 1916), aunque el mismo grupo en 1917 concluyó que poseía características similares a la familia *Dothideales* (Luttrell, 1951), por lo que finalmente fue incluida en el orden *Dothideales*.

Miller (1928) dividió el orden *Dothideales* en tres órdenes: *Sphaeriales*, *Dothideales* y *Pseudosphaeriales* y asignó el género *Botryosphaeria* al orden *Pseudosphaeriales*. Varios autores desarrollaron distintos estudios taxonómicos para dilucidar si *Botryosphaeria* debería mantenerse en el orden *Pseudosphaeriales*, posteriormente llamado *Pleosporales* (Luttrell, 1955; Erikson, 1981 y Barr, 1987) mientras que otros autores (Von Arx y Müller, 1975 y Von Arx, 1987) incluyeron *Botryosphaeria* en el orden *Dothideales*.

Estudios taxonómicos basados en la comparación de la secuencia ITS (Internal Transcribed Spacer) revelaron que podían diferenciarse dos grupos, especies con anamorfo tipo *Diplodia* y especies con anamorfo tipo *Fusicoccum* (Jacobs y Rehner, 1998; Denman y col., 2000). Recientemente (Phillips y col., 2005) han introducido un nuevo grupo que alberga las especies que poseen anamorfo del tipo *Dothiorella*. Recientemente Crous y col. (2006) y Phillips y col. (2007) han realizado una revisión completa del género obteniendo hasta 12 grupos distintos. Las especies descritas como patógenas de vid aisladas en Castilla y León pertenecen a los siguientes géneros:

- Género *Diplodia* (con anamorfos distribuidos en varios géneros):

- *Diplodia seriata* De Not (antes *Botryosphaeria obtusa*). Las ascas son de tonalidad oscura pero con el estrato interior hialino, sumergidas, uniloculadas, y con una pared fina presentando *textura angularis*. Las ascosporas tienen un tamaño de 26-34 x 7-12 µm, hialinas y aseptadas. No presenta conidióforos. Los picnidios son uniloculares, inmersos y presentan un único ostiolo central (Figura 11E). Las conidias tienen un tamaño 25-27 x 10-12 µm, de tonalidad marrón, aseptadas, de superficie rugosa, redondeadas pero con la base truncada. Esta especie adquiere una tonalidad marrón-grisácea cuando es cultivada sobre medio de cultivo MEA, presentando un micelio aéreo muy denso (Figura 11A). Este hongo puede encontrarse sobre la madera muerta o en descomposición, en un amplio número de huéspedes.

- *Diplodia mutila* (Fr.) Mont. (antes *Botryosphaeria stevensii*). Las ascas son de tonalidad oscura con el estrato interior hialino, sumergidas, uniloculadas, y con pared fina presentando *textura angularis*. Las ascosporas tienen un tamaño de 28-35 x 10-12,5 µm, hialinas y aseptadas pero con la edad llegan a tornarse marrones y alguna de ellas



puede presentar septación. No presenta conidióforos. Los picnidios presentan un tamaño comprendido entre los 130-195  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se desarrollan individualmente o en grupos en el tejido cortical muerto. Tienen aspecto globoso, tonalidad negra, son uniloculares, inmersos y con textura angular. También presentan un ostiolo central. Las conidias tienen un tamaño de 23,5-27 x 12-14  $\mu\text{m}$ , son unicelulares, aseptadas, cilíndricas y sin rugosidad en la superficie. Es la especie que más se encuentra dentro del género *Botryosphaeria*, presentándose sobre la madera muerta de muchos cultivos, sobre todo en árboles frutales y vid. Esta especie ha sido asociada a la enfermedad de la necrosis del leño o “Black Dead Arm” en los viñedos de Hungría (Lehoczky, 1974).

• Género *Botryosphaeria* (con anamorfo *Fusicoccum*):

- *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces & De Not. Las ascas tienen un tamaño de 102-156 x 17-24  $\mu\text{m}$ , cilíndricas, cada una tiene ocho ascosporas y una membrana gruesa formada por dos capas. Las ascosporas tienen un tamaño de 18-25,5 x 7.5-12  $\mu\text{m}$ , hialinas, aseptadas, unicelulares y ovoides o elípticas sin rugosidad en la cara exterior. Presentan un aspecto oval. Los picnidios son esféricos con un diámetro de 153-197  $\mu\text{m}$ , tienen un color negruzco desarrollando el ostiolo interiormente. Las conidias tienen un tamaño de 21-28,5 x 4-4,5  $\mu\text{m}$ , hialinas, aseptadas, fusiformes, elípticas con el apéndice estrecho y la base truncada. En medio de cultivo PDA, el cultivo inicialmente toma una tonalidad clara blanquecina con abundante micelio aéreo, volviéndose gris oscuro. Con la edad el color del cultivo se va tornando negro en la periferia de la placa.

• Género *Dothidottia* (con anamorfo *Dothiorella*):

- *Dothiorella iberica* A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves (antes *Botryosphaeria iberica*). Las ascas tienen un tamaño de 100-125 x 18-25  $\mu\text{m}$ , son cilíndricas, y bitunicadas. Las ascosporas 18-29 x 8,5-12,5  $\mu\text{m}$ , fusiformes y tabicadas. Los conidióforos son globosos de 450  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las células conidiógenas son hialinas y subcilíndricas, 8-15 x 3-5  $\mu\text{m}$ . Las conidias tienen un tamaño de 23-26 x 9-12,5  $\mu\text{m}$ , uniseptados ovoides y oscuros (Phillips y col., 2005)

- *Dothiorella sarmentorum* (Fr.) A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque (antes *Diplodia sarmentorum*). Las ascas tienen un tamaño de 140-210 x 17-24  $\mu\text{m}$ , cilíndricas y bitunicadas. Las ascosporas son irregulares, uniseptadas de 21-30 x 10-14  $\mu\text{m}$ . Los conidióforos son globosos de 450  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las conidias son uniseptadas, ovoides marrones de 17,5-24,5 x 8-11,5  $\mu\text{m}$  (Phillips y col., 2005) (Figura 11I).

- *Dothiorella viticola* A.J.L. Phillips & J. Luque (antes *Botryosphaeria viticola*). Las ascas son bitunicadas y clavadas, tienen un tamaño de 100-110 x 25-30  $\mu\text{m}$ . Las

ascosporas fusiformes y clavadas de 19-27 x 8,4-14,5  $\mu\text{m}$ . Los conidióforos tienen un diámetro de 200-360  $\mu\text{m}$ . Las conidias son uniseptadas, ovoides, oscuras de 16-26 x 7-12  $\mu\text{m}$  (Luque y col., 2005).

- Género *Neofusicoccum* (teleomorfo *Botryosphaeria-like*):

- *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (antes *Botryosphaeria parva*). Las ascas tienen un tamaño 75-145 x 17-20  $\mu\text{m}$  de tamaño y cilíndricas. Las ascosporas 18-27 x 8-11  $\mu\text{m}$ , hialinas y aseptadas. Los conidióforos y las células conidiógenas emergen del interior de las paredes del ostiolo. Los picnidios no se distinguen de la especie *Botryosphaeria dothidea*. Las conidias tienen un tamaño de 15-20 x 4,5-6  $\mu\text{m}$ , hialinas, unicelulares y con forma elipsoidal. Sus paredes son muy finas y no presentan rugosidad.

Existe una cierta controversia sobre el papel de estos hongos como patógenos, algunos estudios apuntan que se trata de patógenos primarios que van adquiriendo cada vez más importancia, tanto en viña como en otros cultivos leñosos. Aunque aún no existen estudios concluyentes sobre su epidemiología, ciertas observaciones señalan que son patógenos que se aíslan principalmente en la zona de injerto y en sarmientos jóvenes a partir de las heridas de poda, por lo que posiblemente se transmitan por diseminación aérea o por los útiles de corte, bien a partir de conidios producidos sobre el tejido enfermo o simplemente por fragmentos de dicho tejido (Crous y col., 2006).

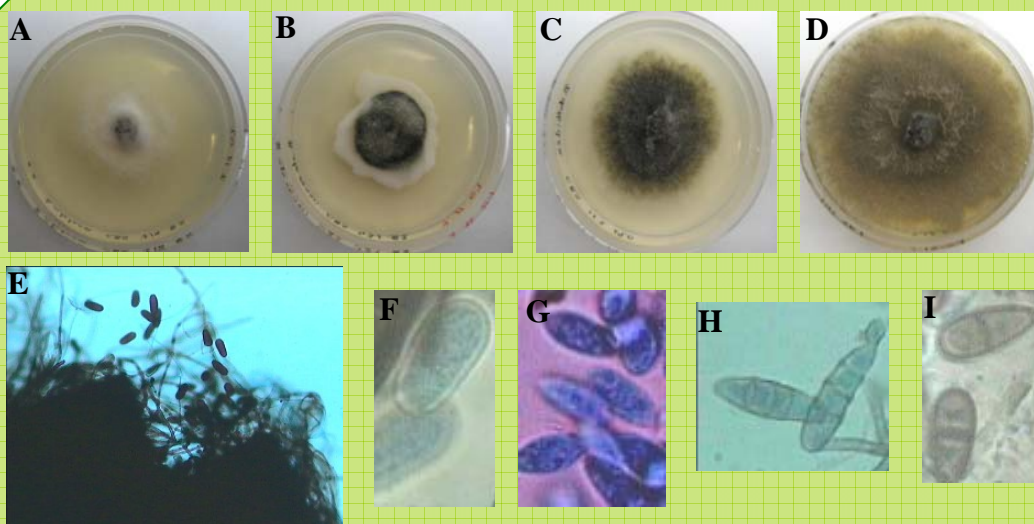
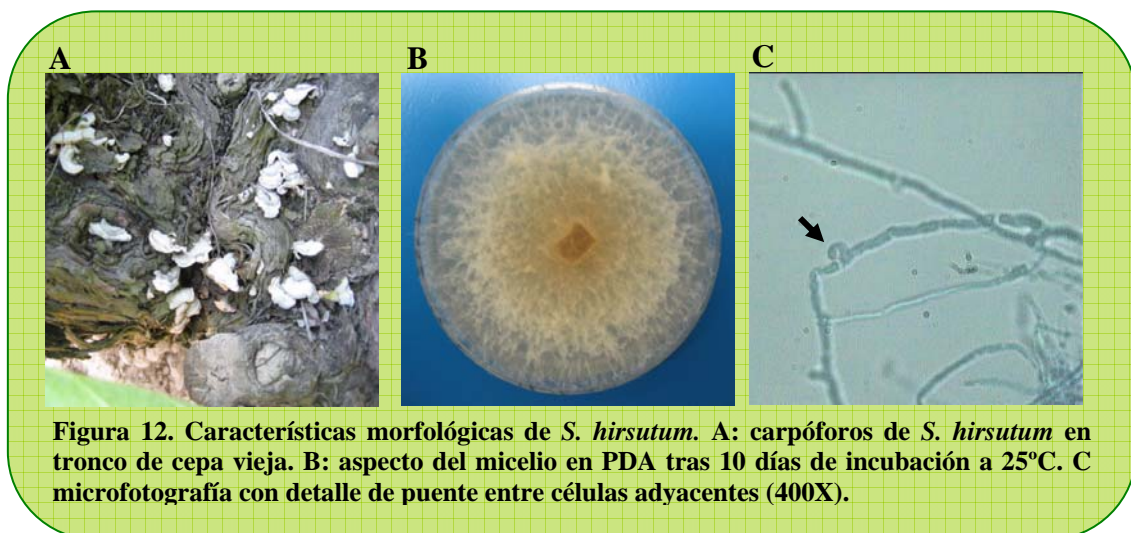


Figura 11. Características morfológicas de distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae. A-D morfología del micelio en PDA tras siete días de incubación a 25°C (A: *D. seriata*; B: *D. mutila*; C: *B. dothidea*; D: *N. parvum*). E: picnidio de *D. seriata* con esporas emergiendo por el ostiolo (100X). F-I morfología de las esporas (400X) de los distintos géneros de Botryosphaeriaceae implicados en los decaimientos de la vid (F: *D. mutila*; G: *N. parvum*; H: *B. dothidea*; I: *Do. sarmentorum*)



### 7.5 *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers

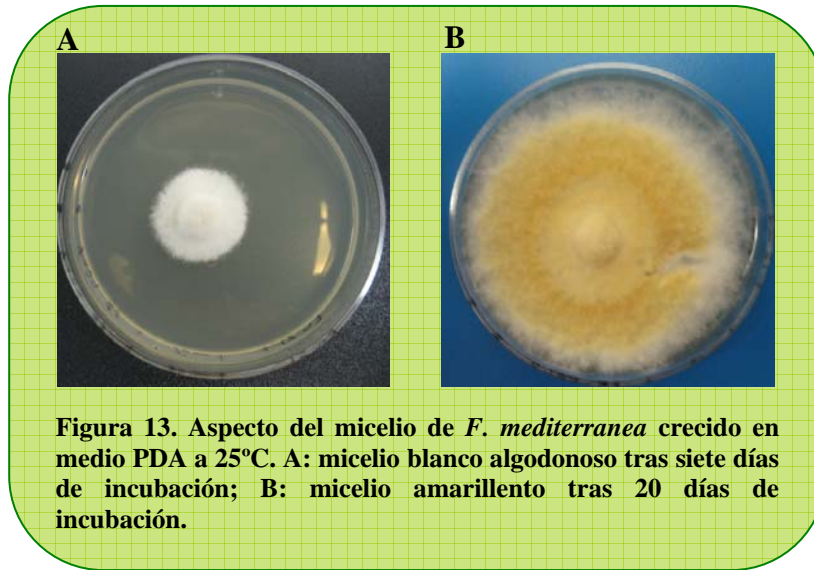
Pertenece a los Basidiomycota; Hymenomycetes; Homobasidiomycetes; Stereales; Stereaceae. Se caracteriza por fructificaciones de 0,5 a 1,5 cm de color naranja a marrón claro (Figura 12A). Las basidiosporas son hialinas elipsoidales a cilíndricas de 5-7,5 x 2,5-3  $\mu\text{m}$  que solo parecen producirse en medio natural. El hongo se conserva en madera marchita o muerta de vid. En medio PDA desarrolla un micelio de color blanco que al envejecer se torna ocre (Dubos, 2002) (Figura 12B). Sus hifas son tabicadas y pueden formar puentes de comunicación entre células adyacentes (Figura 12C). A pesar de que en un principio se consideró como uno de los hongos responsables de la Yesca, estudios posteriores pusieron de manifiesto que *S. hirsutum* tan solo se aislaba en escasas ocasiones por lo que hoy en día existe una gran controversia a cerca del papel que desempeña este hongo en el desarrollo de las enfermedades de la madera.



### 7.6 *Fomitiporia mediterranea* (M. Fischer)

Pertenece a los Basidiomycota; Hymenomycetes; Homobasidiomycetes; Hymenochaetales; Hymenochaetaceae. Fue descrito como hongo asociado a madera de vid con síntomas de Yesca por Michael Fischer (1996). Junto con *S. hirsutum* son los responsables de la descomposición de la madera formando los chancros característicos de la madera con Yesca: zonas claras y esponjosas. Este basidiomyceto forma carpóforos que pueden observarse a simple vista en la corteza de la planta. En los troncos de vid se pueden observar unas almohadillas irregulares de un centímetro de diámetro similares a los producidos por *S. hirsutum*. Al desarrollarse, la superficie de estas estructuras presenta poros. Las basidiosporas son hialinas, lisas y globulosas de unos 5-6  $\mu\text{m}$ . En medio de cultivo PDA, el micelio primero es de color blanco que al

envejecer se vuelve amarillo-ocre algodonoso (Figura 13). En medio de cultivo no produce esporas (Dubos, 2002).



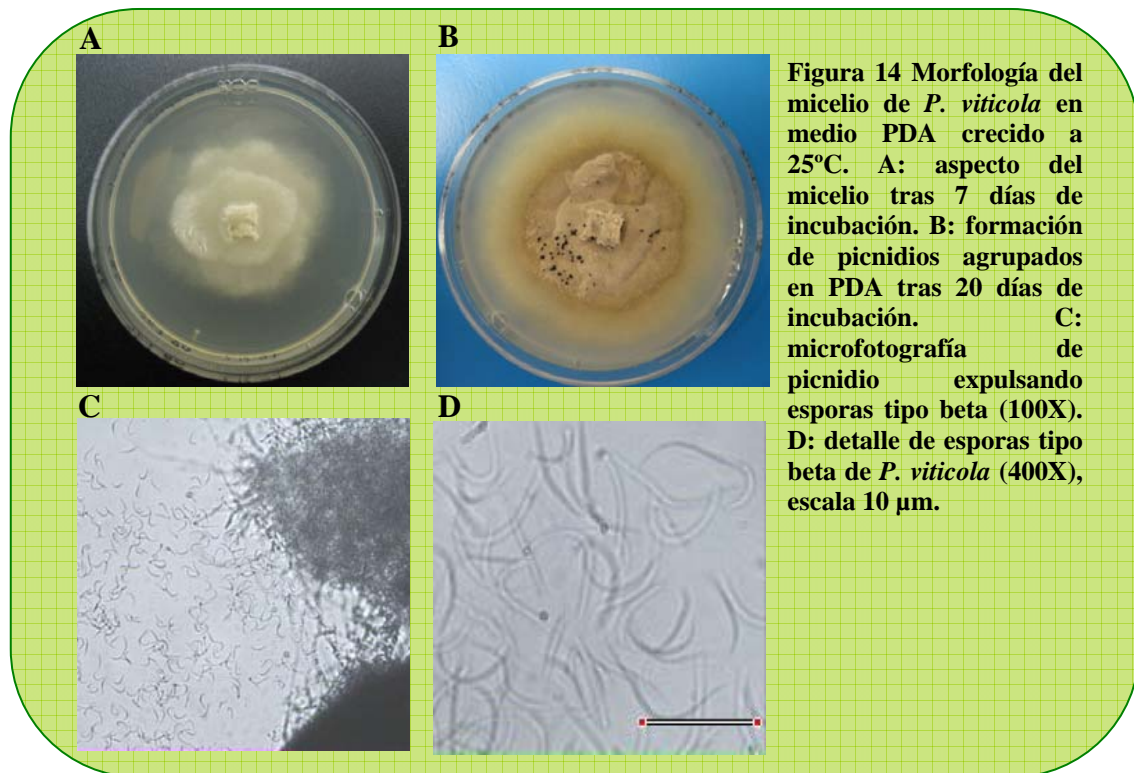
**Figura 13. Aspecto del micelio de *F. mediterranea* crecido en medio PDA a 25°C. A: micelio blanco algodonoso tras siete días de incubación; B: micelio amarillento tras 20 días de incubación.**

### **7.7 *Phomopsis viticola* (Saccardo)**

Pertenece a los *Ascomycota*, *Sordariomycetes*, *Diaporthales*, *Valsaceae* y es el agente causal de la excoriosis de la vid. Esta enfermedad fue observada por primera vez en Suiza en 1967. Originalmente el hongo fue aislado en Francia en 1880 por Saccardo e identificado como *Phoma viticola*. En 1915 Saccardo lo transfirió a un nuevo género denominado *Phomopsis*. Investigadores australianos describieron dos grupos de *Phomopsis* en vid: *Phomopsis* tipo 1 y *Phomopsis* tipo 2, responsables de los daños producidos en sarmiento y en hoja característicos de esta enfermedad. Análisis moleculares de ambos grupos renombraron el primer grupo como *Diaporthe perijuncta* (teleomorfo de *Phomopsis viticola*) y el segundo grupo como *Phomopsis viticola* (anamorfo). Mostert y col. (2001) propusieron una clave de identificación para las especies del tipo *Phomopsis* basándose en características morfológicas, patogénicas y moleculares estableciendo cinco grupos: *P. viticola*, *Phomopsis* sp.2, *P. amygdali*, *Diaporthe perijuncta* y *Phomopsis* sp. 1. Posteriormente describieron hasta 15 especies distintas de *Phomopsis* aisladas de vid.

*Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc (teleomorfo *Cryptosporella viticola*), produce picnidios negros que tienen un diámetro de 0,2 a 0,4 mm. Las esporas pueden ser de dos tipos: alfa hialinas, en forma de uso de 7-10 x 2-4 µm contenidas en un picnidióforo con ápice puntiagudo de 12-20 x 2 µm; beta, son largas, curvadas, filiformes que miden 18-30 x 0,5-1 µm y son producidas en un picnidióforo de 5-8 x 1,5 µm. En los pámpanos verdes, el micelio invade principalmente el tejido del parénquima cortical. El micelio es

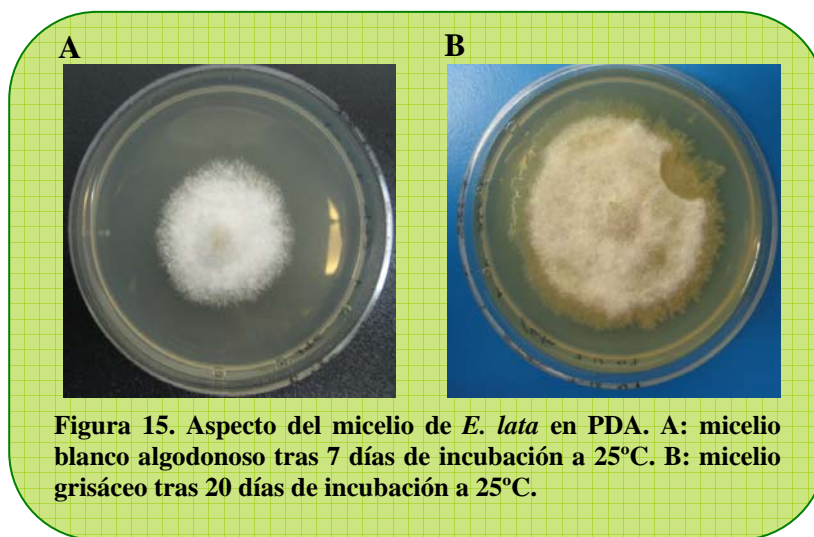
claro y forma marañas parenquimatosas entre las células huésped. Los picnidios se forman en las áreas negras al cabo de 14 días después de la infección (Hewitt y Pearson, 1996). En el laboratorio, en medio de cultivo PDA el micelio es hialino, septado y ramificado y forma una densa maraña. Los picnidios se forman irregularmente en las partes oscuras de la maraña de manera individual o en grupos.



### 7.8 *Eutypa* spp.

El género *Eutypa* pertenece a los *Ascomycota*, *Sordariomycetes*, *Xylariales*, *Diatrypaceae*. Las especies descritas como patógenas de vid son *E. lata* (anamorfo *Libertella blepharis*) y *E. leptoplaca*. Desde 1957 se sabe que este hongo es el causante de la apoplejía del albaricoquero, en 1973 se demostró su patogenicidad en vid, además de estos huéspedes, a *Eutypa* spp. se le ha descrito en más de 80 especies de leñosos. A pesar de haber sido descrito como agente causal de la Eutipiosis, enfermedad a la que da nombre, en Castilla y León apenas se aísla de plantas con síntomas claros de Eutipiosis mientras que se aíslan otros hongos asociados a otros decaimientos. A diferencia de la mayoría de los hongos asociados a estas enfermedades, *E. lata* posee un modo de acción conocido. Los daños que provoca se deben a la acción de una toxina lipofílica, la eutypina, que actúa a nivel mitocondrial causando cambios drásticos en la respiración y el balance energético (Deswarte y col. 1996).

Produce estromas periteciales en la madera de la planta atacada, al principio en pequeñas manchas que rodean el sitio original de infección, o algunas veces, en la herida de la cepa que originó el punto de entrada, varios años después de la infección. Las ascosporas son expulsadas de las peritecas por la lluvia, son transportadas por el aire y penetran en el huésped a través de heridas. Las ascosporas germinan con temperaturas comprendidas entre 1-30°C y su micelio penetra al interior del tejido comenzando la colonización de la madera (Dubos, 2002). *Eutypa lata* produce ascosporas de color amarillo pálido algo curvadas de 6,5-11 x 1,8-2 µm de tamaño en ascas de 30-60 x 5-7,5 µm con un poro apical. El óptimo para la germinación es 20-25°C necesitando una humedad relativa muy elevada o, incluso, agua libre. Debido al lento proceso de colonización de los tejidos sólo produce daños graves en vides adultas. En medio de cultivo PDA se observa un micelio blanco aéreo que al envejecer se torna de color gris (Figura 15), no produce estructuras sexuales en medios de cultivo artificiales por lo que su identificación se basa en la morfología del micelio. La confirmación puede realizarse en base a la morfología de sus conidios pero no todos los aislados son capaces de producir conidios *in vitro* (Carter, 1991).



**Figura 15. Aspecto del micelio de *E. lata* en PDA. A: micelio blanco algodonoso tras 7 días de incubación a 25°C. B: micelio grisáceo tras 20 días de incubación a 25°C.**

## 8. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS

Durante décadas, la identificación de los hongos asociados a los decaimientos de la vid, se ha venido realizando por métodos clásicos, entre los que se incluyen: estudio de las características del micelio en distintos medios de cultivo, crecimiento a distintas temperaturas, presencia de determinadas estructuras microscópicas, morfología de las esporas, etc. Esta metodología presenta varios inconvenientes debido a que es un

proceso muy lento que puede requerir varios meses de trabajo, es laborioso ya que es necesario conjugar distintas características para poder llegar a una identificación definitiva, y requiere el sacrificio de la mayor parte de la planta para poder aislar los hongos presentes en la muestra.

Los métodos clásicos de identificación además de presentar los inconvenientes ya mencionados, no siempre permiten diferenciar especies pertenecientes a un mismo género. Así, un mismo aislado puede presentar distintas morfologías en el mismo medio de cultivo y las mismas condiciones de crecimiento, lo que dificulta su identificación (Figura 16). Si estas variaciones tienen lugar en un mismo aislado es de suponer que se incrementarán cuando se trate de aislados de distintas procedencias, a pesar de que formen parte de la misma especie.



**Figura 16. Características de cultivo en medio PDA de 9 aislados de *P. aleophilum* procedentes de vid.**

Por otra parte, uno de los atributos de mayor importancia utilizados en este tipo de identificación es el tamaño y tipología de las esporas, pero como ya se ha mencionado en la descripción de algunos de los géneros a estudio, muchas de las especies implicadas en los decaimientos de la vid, no son capaces de esporular en condiciones de laboratorio.

El hecho de tener que sacrificar la mayor parte de la planta para proceder al aislamiento e identificación de los hongos implicados, hace inviable la utilización de estos análisis como método de rutina para la determinación de la presencia o no de patógenos en una planta. Además para el control del material de viveros en plantas jóvenes, en las que la enfermedad está probablemente en estado latente o poco desarrollada, conviene disponer de un método de diagnóstico rápido y preciso como los descritos por Hamelin y col., (1996) para la detección de *C. destructans* o Lecomte y col., (2000) para la detección de *E. lata*, basados en técnicas moleculares (PCR) y utilizando material vegetal como ADN molde. Ridgway y col., (2005) para controlar la enfermedad de Petri han puesto a punto un método basado en PCR que permite detectar 1pg de ADN de *Phaeomoniella chlamydospora* en madera y hasta 50 fg en muestras de suelo. Como no se dispone de cebadores específicos para cada una de las especies será

necesario diseñarlos y para ello tendremos que amplificar y secuenciar distintas zonas del genoma de dichos hongos.

## 9. ESTRATEGIAS DE CONTROL

Las medidas de control que se utilizan tanto para la prevención como para el tratamiento de estas enfermedades consisten en la aplicación de buenas prácticas culturales, agentes físicos, agentes biológicos y agentes químicos.

### 9.1. Métodos culturales.

Los métodos culturales dependen principalmente de las actividades de cultivo del agricultor. Como ejemplo podemos señalar una práctica cultural que se viene practicando desde hace muchos años por los viticultores para luchar contra la Yesca y que consiste en abrir el tronco de la cepa con un hacha e impedir que se cierre colocando una piedra. El fundamento de este método consiste en la dificultad que tienen los hongos causantes de la enfermedad en sobrevivir en presencia de aire. Para hacer frente a los decaimientos de la vid el agricultor debería utilizar material de propagación (estaquillas, yemas, portainjertos, barbados, plantones) libre de patógenos y en los casos en los que la enfermedad ya haya aparecido, eliminar lo antes posible la madera enferma así como los residuos procedentes de la poda de las cepas afectadas; tratar las heridas para evitar contagios y desinfectar los utensilios de poda entre cepa y cepa.

### 9.2. Métodos físicos.

Los agentes físicos que con mayor frecuencia se utilizan para controlar las enfermedades de las plantas son la temperatura, el potencial hídrico, el aire seco, las longitudes de onda perjudiciales de la luz y varios tipos de radiación. En los viveros australianos recurren a tratamientos con agua caliente como medida profiláctica de rutina. En California también se está empezando a extender este método que consiste en sumergir los plantones en baños de agua a 50°C durante 15-30 minutos. A pesar de que los resultados obtenidos en diversos estudios realizados sobre la efectividad de este tratamiento (Crous y col., 2001; Laukart y col., 2001; Rooney y col., 2001) han proporcionado resultados variables, si han podido demostrar que, al menos *in vitro*, el tratamiento a 51°C previene la germinación de esporas (Whiting y col., 2001).

### 9.3. Métodos biológicos.

Se entiende por control biológico “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a



través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas” (Baker y Cook, 1974). No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo del patógeno como son: antibiosis (sustancias producidas por un microorganismo que resultan tóxicas para otro u otros organismos); competencia por espacio o por nutrientes; interacciones directas con el patógeno (parasitismo y predación); e inducción de resistencia.

Uno de los métodos más estudiados actualmente es el biocontrol basado en la utilización de aislados de *Trichoderma harzianum*, capaces de controlar a hongos patógenos en diferentes etapas de desarrollo. En un estudio realizado en Sudáfrica por Fourie y col. (2001), comprobaron el potencial de los tratamientos de inoculación de *Trichoderma* en las raíces de las plantas de vivero para el control de la enfermedad de Petri y la enfermedad del Pie Negro. En Bolonia (Italia), evaluaron los efectos de *Trichoderma harzianum* sobre plantas certificadas de un vivero comercial inoculadas con *Phaeomoniella chlamydospora*. Las plantas fueron tratadas a nivel del callo de injerto y en las raíces. Se llegó a la conclusión que el tratamiento más efectivo es el realizado inoculando las raíces con *Trichoderma*, llegando a reducir las áreas necrosadas producidas por el hongo (Di Marco y Osti, 2007).

#### **9.4. Métodos químicos**

Los fungicidas químicos se utilizan para erradicar un patógeno que ya ha infectado la planta, para inhibir el desarrollo del patógeno o para prevenir el desarrollo de la enfermedad. Estos productos químicos inhiben la germinación, el crecimiento o la reproducción del patógeno, o son letales para el hongo. Se distinguen dos tipos de fungicidas: los de contacto, son incapaces de penetrar en el interior del vegetal; mientras que los sistémicos, atraviesan la cutícula y alcanzan vía floema diferentes puntos del vegetal. Normalmente, los fungicidas sistémicos sirven para controlar el ataque de hongos endófitos y su tratamiento es curativo. Los fungicidas se pueden aplicar al suelo para el control de hongos que parasitan órganos subterráneos y/o semillas en germinación o a la planta para controlar enfermedades provocadas por hongos que afectan a tallos, hojas, flores y frutos.

Debido a la prohibición del uso del arsenito sódico, y al no existir hasta el momento ninguna materia activa eficaz para el tratamiento de los decaimientos de la vid, durante los últimos años muchos grupos en todo el mundo han centrado sus

investigaciones en la búsqueda de fungicidas que permitan frenar el aumento de estas enfermedades y ofrecer una solución a los viticultores que observan año tras año cómo aumentan las pérdidas en sus parcelas. En Nueva Zelanda, Jaspers (2001) ensayó el efecto de distintos fungicidas sobre la capacidad de germinación y crecimiento de *P. chlamydospora*, en Portugal Rego y col., (2006) ensayaron la sensibilidad de *C. destructans* a distintos fungicidas, en Sudáfrica Fourie y Halleen (2006) estudiaron el efecto protector de varias materias activas durante las distintas fases de propagación del material en un invernadero y Nita y col., (2006) probaron la eficacia de distintos fungicidas frente a *Phomopsis viticola*.

El principal problema que plantea el uso de fungicidas en el tratamiento de los decaimientos de la vid es la dificultad que supone vencer las distintas barreras de la planta y que el fungicida penetre en la madera. Una de las técnicas más recientes consiste en la inyección directa al tronco de distintos fungicidas. Actualmente existen varios grupos en todo el mundo estudiando la viabilidad de esta técnica (Dula y col., 2007; Darrieutort y Lecomte, 2007).



## Objetivos



El presente trabajo forma parte de dos proyectos de investigación cuyo objetivo es ahondar en el conocimiento de las enfermedades de la madera de la vid producidas por hongos en Castilla y León. Hasta que en 2001 el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) comenzó a realizar prospecciones de campo para evaluar los daños, ningún grupo en Castilla y León había sabido dar una respuesta a la creciente preocupación de los viticultores debido al avance de unas enfermedades de las que poco se conocía hasta el momento. Fue entonces cuando se inició el proyecto “Identificación de la presencia y daños de la Yesca, de los organismos implicados y de las posibles formas de control tanto culturales como químicas en las principales zonas vitícolas de Castilla y León” subvencionado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, VIN01-011), que hizo posible la consolidación de esta nueva línea de investigación en el ITACyL y supuso la financiación por parte del INIA del proyecto “Identificación de los hongos asociados al decaimiento de la vid y caracterización molecular de *Botryosphaeria* y *Phaeomoniella*” (RTA04-127), cuyos resultados son los que se exponen en este trabajo en base a los siguientes objetivos:

**I.** Seguimiento de las enfermedades de la madera de vid producidas por hongos, en las distintas DD.OO. de Castilla y León, estableciendo la incidencia de cada una de las enfermedades a lo largo de los años de estudio.

**II.** Aislamiento e identificación de los hongos asociados a los decaimientos de la vid, puesta a punto de técnicas de detección existentes y diseño de nuevos métodos de diagnóstico molecular que permitan mejorar la detección.

**III.** Estudio de la variabilidad genética de *P. chlamydospora*.

**IV.** Estudio de la efectividad de fungicidas comerciales frente a las especies asociadas a los decaimientos de la vid.

**V.** Puesta a punto de métodos de inoculación que permitan el ensayo de los sistemas de detección a partir de material vegetal, así como la respuesta de las distintas especies a la acción de fungicidas *in vitro*.



Capítulo I

**Evolución de los decaimientos de la  
vid en Castilla y León**

Aislamiento e identificación de los hongos asociados.



## Introducción

Las enfermedades de decaimiento de la vid, entre las que se incluyen Eutipiosis, Yesca, Enfermedad de Petri, Black Dead Arm, Pie Negro o Diplodia Cane Dieback han aumentado considerablemente durante los últimos diez años, no sólo en Castilla y León sino también en todas las zonas vitivinícolas mundiales. Este aumento puede ser debido a la modificación de las prácticas culturales, propagación de material contaminado en viveros, ausencia de protección de las heridas de poda, así como la prohibición o restricción, en función del país, del uso del arsenito sódico (Chiarappa, 2000; Graniti y col., 2000).

Surico y col., (2004), publicaron un estudio en el que hacían un análisis pormenorizado de los posibles factores que habían contribuido a un aumento de la Yesca en Italia (Toscana) durante los años ochenta. Un invierno con heladas (1984-1985) seguido de un año cálido y húmedo (1986) provocaron un aumento desorbitado de la Yesca cuya incidencia alcanzó ese año valores del 15-20%. A parte de las condiciones climáticas favorables que se dieron ese año para el desarrollo de la Yesca, se apunta otra serie de factores que contribuyeron al aumento de la enfermedad, entre ellas:

- Prohibición del uso del arsenito sódico en Italia en 1977.

- Aumento de la ayudas de la Unión Europea para nuevas plantaciones, lo que provocó una gran demanda de material vegetal y llevó a un aumento de la producción en los invernaderos, con escasos controles sanitarios.

- Propagación de material vegetal con esporas latentes.

- Cambio en las prácticas culturales: mayor densidad de plantación, uso de maquinaria para el laboreo que provoca mayores daños en las plantas, cambio en el tipo de poda. Investigaciones llevadas a cabo por un grupo francés en 1921 pusieron de manifiesto la influencia del tipo de poda en la susceptibilidad de las cepas a sufrir Yesca. La mayor incidencia tuvo lugar en cepas podadas en Guyot doble (15-20%), seguida de Guyot simple (10-25%), Gobelet o Robat (0-5%) y por último las menos susceptibles fueron las cepas podadas en cordón vertical (0-1%).

A estas enfermedades se les asocian hongos que provocan la podredumbre de la vid. Se desarrollan preferentemente en las células del xilema obstruyendo los vasos e impidiendo la correcta circulación de la savia (Pascoe, 2000). La mayoría de estos patógenos producen esporas que la lluvia, el viento y otros factores transportan de una cepa a otra. Si las condiciones son propicias, la espora germina y al desarrollarse causa

un nuevo foco de podredumbre de la madera. Otras posibles fuentes de infección pueden ser debidas a la planta madre y a las posibles manipulaciones llevadas a cabo en los viveros para la producción de plantas (Fourie, 2004). Estas plantas al llevarlas al campo pueden constituir nuevos focos de infección y propagación de distintos hongos. Se dice que en el desarrollo de los hongos y en la aparición de síntomas intervendrían los factores climáticos como la humedad y la temperatura. También se le da un papel importante al estrés al que por razones bióticas o abióticas esté sometida la planta. Otra hipótesis sobre la que se trabaja es que estas enfermedades se propagan al podar las viñas, con herramientas contaminadas. Las heridas producidas son una puerta de entrada de microorganismos. Lamentablemente se conoce muy poco de las condiciones y modos de transmisión de estas enfermedades por ello de forma genérica se recomienda utilizar todas las medidas profilácticas que se puedan (García Jiménez, 2004).

Hasta la prohibición del uso del arsenito sódico en España (julio 2003), las cepas que presentaban sintomatologías características de los decaimientos de la vid en Castilla y León apenas alcanzaban un 2%, valor que no causaba alarma en el sector, a pesar de que una de cada dos parcelas muestreadas presentaron síntomas de decaimiento de la vid (Santiago y col., 2004).

De las investigaciones realizadas en distintos países se desprende que los hongos generalmente aceptados como asociados a los decaimientos de la vid son *Phaeomoniella chlamydospora*; *Phaeoacremonium* spp., principalmente *Phaeoacremonium aleophilum*; *Cylindrocarpon* spp., principalmente *C. macrodidyma* y *C. liriodendri*; distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae; *Phomopsis viticola*; *Eutypa lata*; *Fomitiporia mediterranea* y *Stereum hirsutum* (Martín y col., 2005).

Bernadette Dubos en su libro “Maladies cryptogamiques de la vigne” (2002) relaciona una enfermedad con los síntomas morfológicos y los hongos que los producen. Así, por ejemplo, *Eutypa lata* es responsable de la Eutipiosis, el hongo causante de la excoriosis es *Phomopsis viticola*, el Pie Negro es producido por hongos del suelo del género *Cylindrocarpon*, especies de la familia Botryosphaeriaceae son responsables de enfermedades como Black Dead Arm y Diplodia Cane Dieback, mientras que *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* son los hongos causantes de la enfermedad de Petri en planta joven. Dubos mantiene la hipótesis de que la enfermedad de Petri es el precursor de la Yesca en planta adulta, considerando que si una cepa joven con Petri sobrevive a la infección, al cabo de los años puede ser invadida por otros hongos patógenos como *Fomitiporia mediterranea* y



*Stereum hirsutum* que producen pudrición de la madera de una forma muy característica que se conoce como Yesca.

Otros estudios realizados sobre los decaimientos de la vid, revelan que los hongos aislados de plantas con síntomas de decaimientos, no permiten llegar a relaciones tan claras entre síntomas y hongo/s asociado/s (Armengol y col., 2001; Santiago y col., 2004; Cobos y col., 2007). Por ejemplo, en plantas con síntomas de Yesca, enfermedad de Petri o Eutipiosis, se han llegado a aislar *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae. Este hecho puede ser explicado debido a que estas especies invaden los haces vasculares de la planta, obturando los vasos lo que provoca un debilitamiento de la planta por disminución del flujo de savia, y hace que distintos hongos produzcan síntomas muy similares no tanto debido a la especie sino a la invasión de vasos y tejidos. Otro de los mecanismos moleculares implicados en el proceso patogénico es la producción de metabolitos tóxicos por parte de hongos como *E. lata*, *F. mediterranea*, *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* y especies de la familia Botryosphaeriaceae (Fallot y col., 1997; Evidente y col. 2000; Tabacchi y col., 2000; Martos y col., 2007).

Al problema de la similitud de los síntomas se une el hecho de que los síntomas externos que acompañan a estas enfermedades no aparecen sistemáticamente todos los años, sino que las plantas pueden padecer una enfermedad y manifestarlo externamente o no en función numerosos factores entre los que destacan las condiciones climatológicas, lo que obliga a un seguimiento continuo de las parcelas, y hace que las valoraciones basadas en sintomatología externa fluctúen dependiendo de factores como la humedad y la temperatura (Cobos y col., 2007).

## Materiales y métodos

### 1. Muestreo de parcelas

Durante los años 2000-2007 se llevó a cabo un seguimiento de las enfermedades de la vid en las principales denominaciones de origen de la región. De cada una de ellas se seleccionaron un mínimo de tres parcelas hasta un total de 18 (excepto en la D.O. Tierra de León que se muestreó una única parcela), y se realizó el seguimiento de 1000 cepas por parcela. Debido a condiciones climatológicas como granizo o lluvias abundantes, algunas parcelas tuvieron que ser sustituidas por otras cercanas. La relación de parcelas que se han muestreado a lo largo de este estudio se detallan en la Tabla 1.

Denominación de origen	localidad	Nº de parcelas
<b>Ribera de Duero</b>	Pedrosa del Rey (Burgos)	1
	La horra (Burgos)	1
	Sotillo (Burgos)	1
	Valbuena de Duero (Valladolid)	2
<b>Cigales</b>	Cigales (Valladolid)	2
	Dueñas (Palencia)	1
<b>Toro</b>	Villaester (Zamora)	1
	El pego (Zamora)	1
	Morales de Toro (Zamora)	1
<b>Rueda</b>	Rueda (Valladolid)	2
	Aldeanueva del codonal (Valladolid)	1
<b>Tierra del vino de Zamora</b>	Jambrina (Zamora)	3
<b>Tierra de León</b>	Valderas (León)	1

**Tabla 1. Parcelas muestreadas a lo largo de este estudio.**

Los muestreos se realizaron en dos épocas del año coincidentes con el desarrollo de la sintomatología característica de las principales enfermedades de la madera: Eutipiosis y Yesca. Las prospecciones de Eutipiosis se realizaron cuando las cepas se encontraron en el estado fenológico H (botones florales separados) que suele desarrollarse en los meses de mayo o junio. Las prospecciones de Yesca se realizaron

cuando las cepas alcanzaron el estado fenológico M2 (pleno envero). De cada una de las parcelas se tomaron muestras para su posterior análisis en el laboratorio.

## 2. Procesamiento de las muestras

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron desinfectadas superficialmente con agua, lejía y jabón, y troceadas transversalmente a distintas alturas en función de la tipología de la planta, en busca de necrosis características de las enfermedades de la madera, siguiendo la metodología de Larignon y Dubos (1997) (Figura 1). Antes de extraer las astillas cada rodaja fue desinfectada superficialmente:

- Las plantas jóvenes fueron desinfectadas por inmersión en una solución de lejía al 50% durante 5 minutos seguida de tres lavados en agua estéril de 5 minutos cada uno.
- Las plantas adultas fueron desinfectadas superficialmente por inmersión en etanol y posterior flameo.

De cada rodaja se extrajeron astillas, tanto de la zona aparentemente sana como de las zonas necrosadas, y se cultivaron en placas Petri (9 cm) con medio MEA (agar extracto de malta). Las placas se mantuvieron en estufa a 25°C. Los hongos que crecieron alrededor de las astillas fueron repicados a nuevas placas Petri con medio PDA (agar patata-dextrosa), e incubadas en estufa a 25°C y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas para favorecer la esporulación de los hongos.



Se analizaron 256 muestras: 85 plantas jóvenes (con 5 años o menos), bien procedentes de vivero o de plantaciones jóvenes que presentaron algún retraso en el desarrollo; y 171 plantas adultas (mayores de 5 años) que presentaban síntomas de Eutipiosis o de Yesca.

### 3. Identificación de hongos por métodos clásicos

La identificación se realizó en base a las características morfológicas del micelio y la tipología de las esporas. Se realizaron preparaciones microscópicas con azul de lactofenol para la observación de las esporas y de las células conidiógenas. Los hongos que no presentaron esporas en estas condiciones de cultivo (*Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Botryosphaeria dothidea* y *Neofusicoccum parvum*), fueron repicados a placas Petri con medio AA (agar agua) al que se añadieron dos acículas de pino estériles. Las identificaciones fueron confirmadas por métodos moleculares basados en la secuenciación del ADN ribosómico, la utilización de cebadores específicos o el estudio de patrones de restricción (Capítulo II). En el caso de *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* y *Stereum hirsutum* no se obtuvieron esporas por lo que las identificaciones se realizaron en base a la morfología del micelio y fueron confirmadas por secuenciación del ADN ribosómico.

### 4. Medios de cultivo

Los medios utilizados para cada uno de los ensayos recogidos en esta memoria fueron los siguientes:

**Medio Agar Extracto de Malta (MEA):** preparado de Merk 35g, en 750 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**Medio Patata Dextrosa Agar (PDA):** preparado de Merk 25 g, en 750 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**Medio Agar-Agua (AA):** agar 12g, en 750 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

A todos los medios se les añadió 0,75 ml del acaricida Dieldrín (0,2g/l, Sigma). Se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Una vez atemperados se les añadió 3,75 ml de Cloranfenicol (0,25 g/l, Merk) para inhibir el crecimiento de bacterias, y se extendieron en placas Petri.

## 5. Cálculo de la tasa de crecimiento

Se sembraron 20 placas con medio MEA para cada uno de los hongos a estudio. Los aislados utilizados fueron suministrados por el CBS (The Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands), cedidos por otros laboratorios, o aislados por nuestro grupo (Tabla 2).

Especie	Aislado	Procedencia	Huésped
<i>Diplodia seriata</i> (= <i>B. obtusa</i> )	CBS 719.85 <sup>a</sup>	Nueva Zelanda	<i>Malus domestica</i>
<i>Diplodia mutila</i> (= <i>B. stevensii</i> )	CBS 431.82 <sup>a</sup>	Holanda	<i>Fraxinus excelsior</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CBS 110302 <sup>a</sup>	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Neofusicoccum parvum</i> (= <i>B. parva</i> )	CBS 110301 <sup>a</sup>	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Dothiorella sarmentorum</i> (= <i>B. sarmentorum</i> )	CBS 120.41 <sup>a</sup>	Noruega	<i>Pyrus communis</i>
<i>Dothiorella iberica</i> ♦ (= <i>B. iberica</i> )	Y81-1-2♦	España	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Dothiorella viticola</i> ♦ (= <i>B. viticola</i> )	Y103-8-1♦	España	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	CBS 239.74 <sup>a</sup>	California, USA	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	jerez┐	Jerez, España	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	CBS 119.41 <sup>a</sup>	Holanda	<i>Fragaria</i>
<i>Neonectria macrodydima</i> ♦	Y242-1-2a♦	España	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Stereum hirsutum</i>	CBS 416.61 <sup>a</sup>	Austria	nd
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Y119-9-1♦	España	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Phomopsis viticola</i>	CBS 267.80 <sup>a</sup>	Italia	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Eutypa lata</i>	ST 309 †	Francia	<i>Vitis vinifera</i>

Tabla 2. Aislados de referencia utilizados en el presente trabajo.

<sup>a</sup> aislados obtenidos del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS);

♦ aislados en el laboratorio de hongos de la vid, dpto. viticultura ITACyL;

┐ aislado cedido por Dr. J. Parra (Jerez, España);

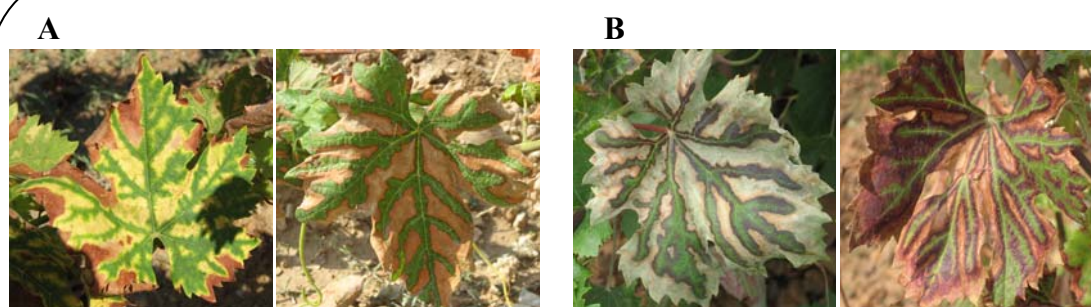
Las placas se incubaron en estufa a 25° C y oscuridad. Se midió el crecimiento cada 24 horas hasta que el hongo se extendió por toda la placa o se observó un estancamiento. Para el cálculo de la tasa de crecimiento radial se tuvo en cuenta el intervalo de 24 horas en que se produjo un mayor crecimiento del hongo, expresando los datos como crecimiento radial en mm/día.

## Resultados

### 1. Evolución de los decaimientos de la vid en Castilla y León (2000-2007)

#### 1.1. Sintomatología tipo “Yesca” y “Eutipiosis”.

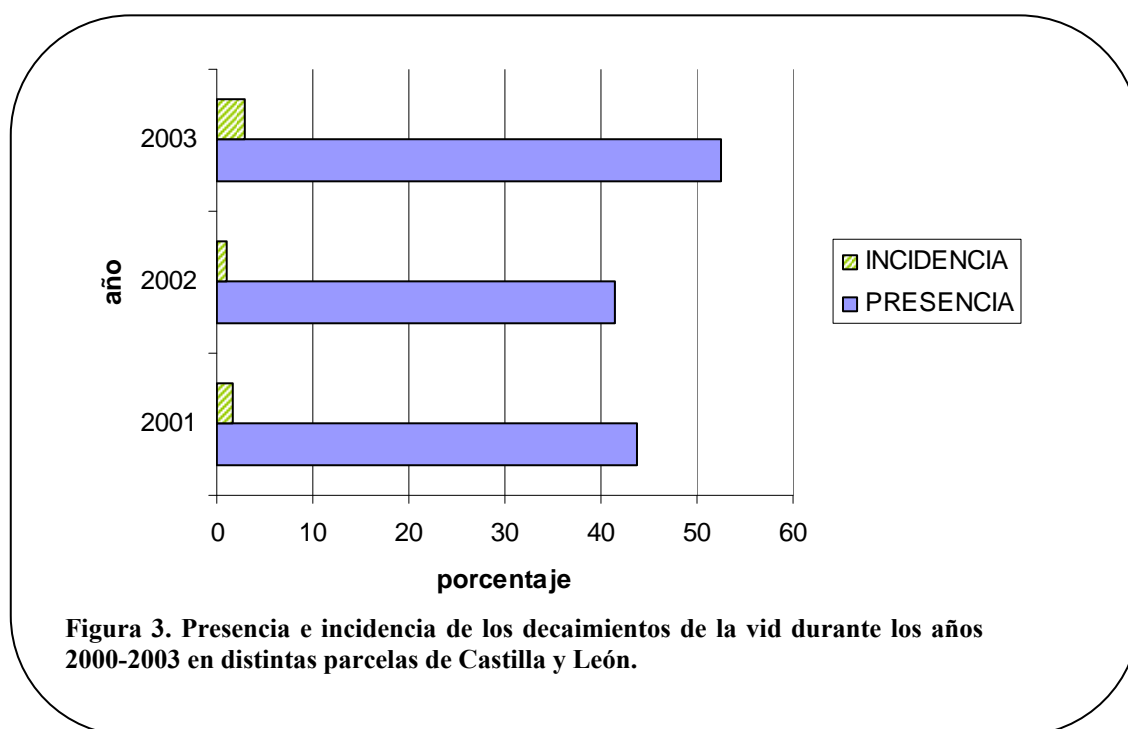
El conjunto de síntomas externos que presenta una cepa en campo no permite concluir de manera fehaciente a qué enfermedad corresponden ni el conjunto de hongos que lo producen. Los síntomas desarrollados por las plantas dependen de muchos factores entre los que se incluyen la variedad a la que pertenece la cepa, así como las condiciones medioambientales. Por esta razón los muestreos se realizaron en base a la sintomatología “tipo Eutipiosis” (Figura 6, Introducción general), y “tipo Yesca” (Figura 3, Introducción general). La sintomatología de ambas enfermedades se detalla en la introducción general de esta memoria. Parte de las muestras recogidas con sintomatología “tipo Yesca” presentaron en cortes transversales necrosis en forma de cuña características de las enfermedades producidas por especies de Botryosphaeriaceae (Figuras 4 y 5, Introducción general). Los síntomas en campo no siempre permiten distinguir claramente entre cepas afectadas con Yesca y cepas afectadas con Black Dead Arm, ambas enfermedades se caracterizan por decoloraciones internerviales de las hojas que se distinguen por la tonalidad, factor subjetivo que a su vez depende tanto de la variedad de la cepa como de las condiciones medioambientales, y que puede ser confundida con otras enfermedades como clorosis o ausencia de distintos metales (Figura 2).



**Figura 2. Manifestación de los síntomas de Yesca y BDA en hoja en distintas variedades de vid A: Decoloraciones internerviales características de Yesca. B: Hojas con síntomas de BDA.**

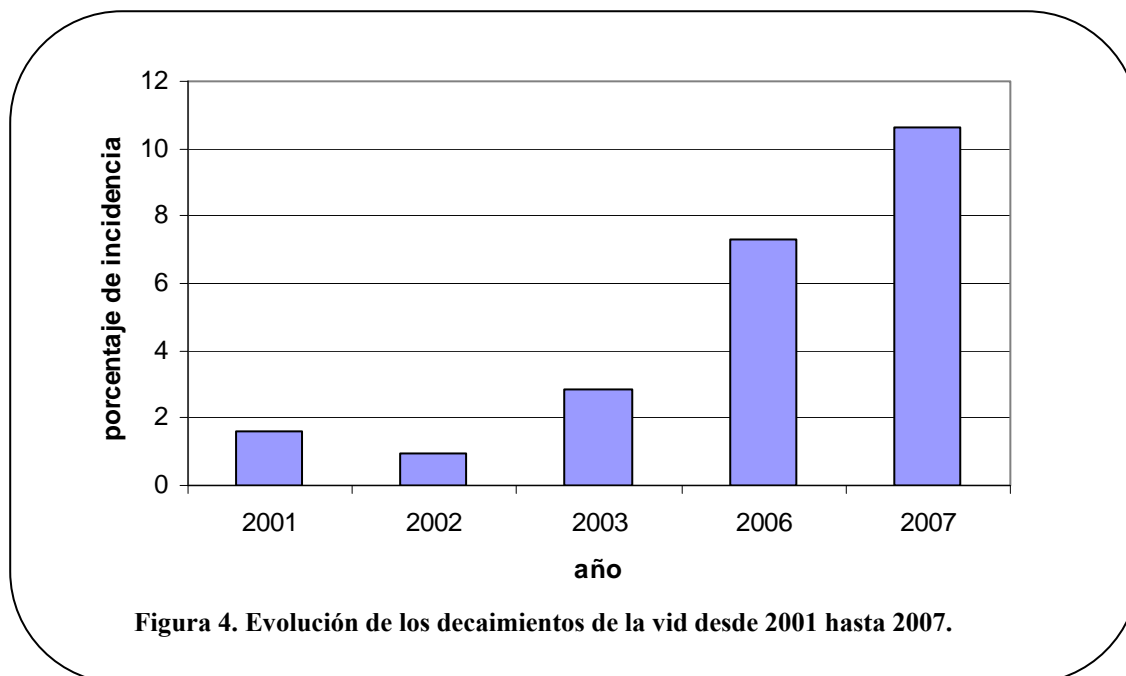
## 1.2. Valoración de los síntomas en campo.

Durante los años 2000-2003 se realizaron prospecciones en las distintas denominaciones de origen de Castilla y León. Los datos revelan un pequeño crecimiento de estas enfermedades en las distintas denominaciones, y a pesar de que los porcentajes no son alarmantes, puede observarse como las enfermedades de la madera causadas por hongos están presentes en el 52,4% de las parcelas muestreadas (año 2003), es decir, una de cada dos parcelas muestreadas contenían al menos una cepa afectada con alguna de las enfermedades relacionadas con los decaimientos de la vid. En cuanto a la incidencia durante esos años se calculó en 1,6% en 2001, 0,98% en 2002 y 2,86% en 2003. Los datos obtenidos se representan en la Figura 3.



El único tratamiento preventivo conocido hasta el momento y que ha demostrado su eficacia frente a los hongos responsables de enfermedades como Yesca y Excoriosis ha sido el arsenito sódico. Este producto ha sido clasificado como muy tóxico (T +) y carcinogénico de categoría 1, debido a esta alta toxicidad se prohibió su uso en Julio de 2003 (Orden APA1610/2003).

Con la prohibición del arsenito sódico se ha producido un aumento considerable de estas enfermedades en las distintas regiones vitivinícolas españolas. Así hemos pasado de un porcentaje de afectación del 2,86% en 2003 a porcentajes del 7,33% en 2006 y 10,63% en 2007 (Figura 4).

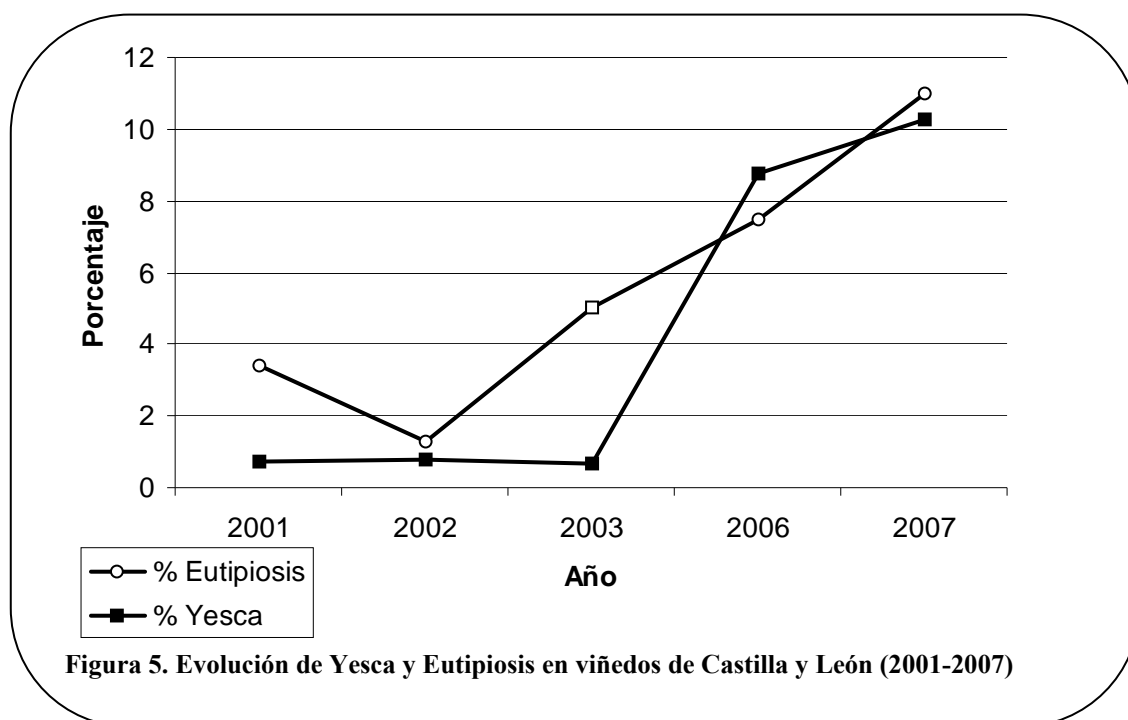


Considerando cada una de las enfermedades por separado podemos apreciar un incremento significativo tanto de Yesca como de Eutipiosis en los últimos años (Figura 5).

Teniendo en cuenta que el arsenito sódico estaba principalmente indicado para el tratamiento de Yesca, se puede observar cómo durante los últimos años en que estuvo permitido su uso los porcentajes de afectación se mantuvieron controlados dentro de unos límites: 0,75% en 2001, 0,76% en 2002 y 0,69% en 2003; mientras que los valores aumentaron en los años sucesivos, llegando a valores del 8,75% en 2006 y del 10,26% en 2007.

Los datos recogidos de los muestreos de Eutipiosis ponen de manifiesto que ya en el año 2003 se había producido un aumento de esta enfermedad. En el 2001 se registró una incidencia del 3,4% que se redujo al año siguiente al 1,28% y volvió a producirse un repunte en el 2003 con un 5,04% de incidencia. Aún así el incremento producido durante el 2006 (incidencia del 7,46%) y el 2007 (incidencia del 11%). Estos datos justifican los esfuerzos realizados durante los últimos años en el estudio de la naturaleza de estas enfermedades, sus causas, así como los medios de control que permitan hacerlas frente.



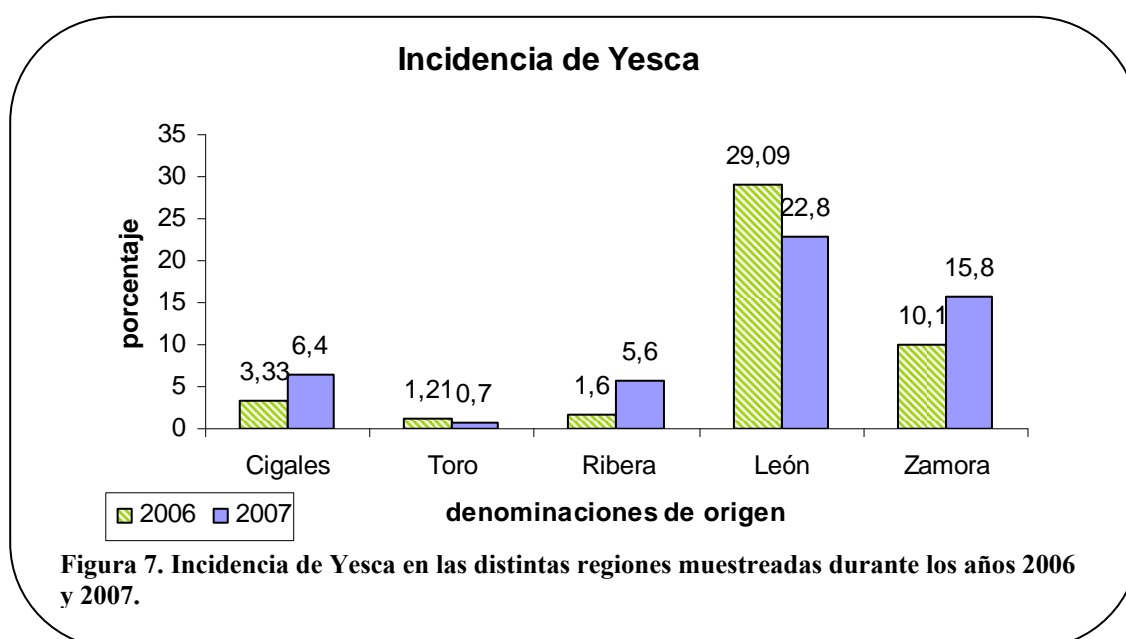
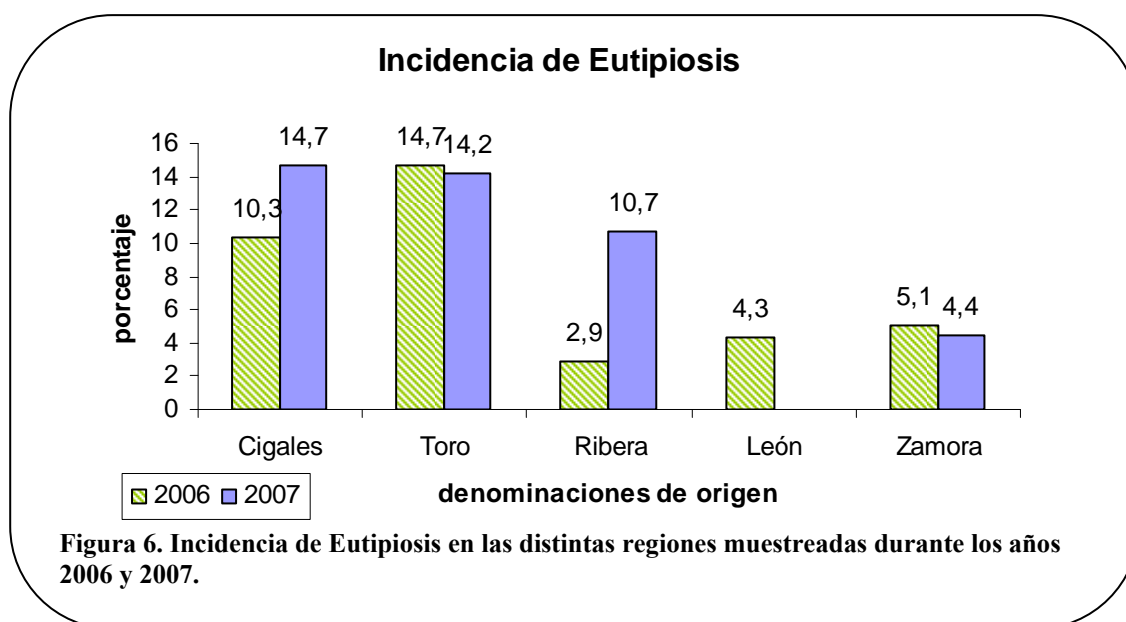


Por denominaciones de origen existen diferencias en cuanto a porcentajes de afectación:

Si tenemos en cuenta los datos de Eutipiosis recogidos en los muestreos realizados durante los años 2006 y 2007 en distintas denominaciones de origen de Castilla y León (Figura 6), en la denominación de origen Cigales se produjo un aumento de la incidencia de 10,3% en 2006 al 14,7% en 2007, la denominación de origen Toro fue la que mayor incidencia presentó con datos similares en ambos años; en Ribera de Duero se produjo un aumento significativo de la incidencia pasando del 2,9% de incidencia en 2006 al 10,7% en 2007; en la zona de León se registró una incidencia del 4,3% en 2006 y las intensas lluvias caídas durante el mes de Mayo, impidieron realizar los muestreos correspondientes al 2007; por último, Zamora presentó porcentajes del 5,4% en 2006 y del 4,4% en 2007.

Por el contrario, las zonas que presentaron un mayor porcentaje de afectación de Yesca fueron León y Zamora, mientras que Cigales, Toro y Ribera de Duero presentaron porcentajes muy bajos (Figura 7). Así en Cigales se registró una incidencia del 6,4% en 2007 dato que a pesar de no alcanzar un valor alarmante casi duplicó los valores obtenidos en el año anterior en el que se registró una incidencia del 3,33%; en Toro la incidencia fue mínima, del 1,21% en 2006 y el 0,7% en 2007; en Ribera de Duero también se ha producido un aumento considerable pasando del 1,6% en 2006 al 5,6% en 2007; la zona de León fue la más afectada por Yesca alcanzándose valores del

29,09% en 2006 y del 22,8% en 2007; por último, Zamora registró una incidencia del 10,1% en 2006 y del 15,8% en 2007.

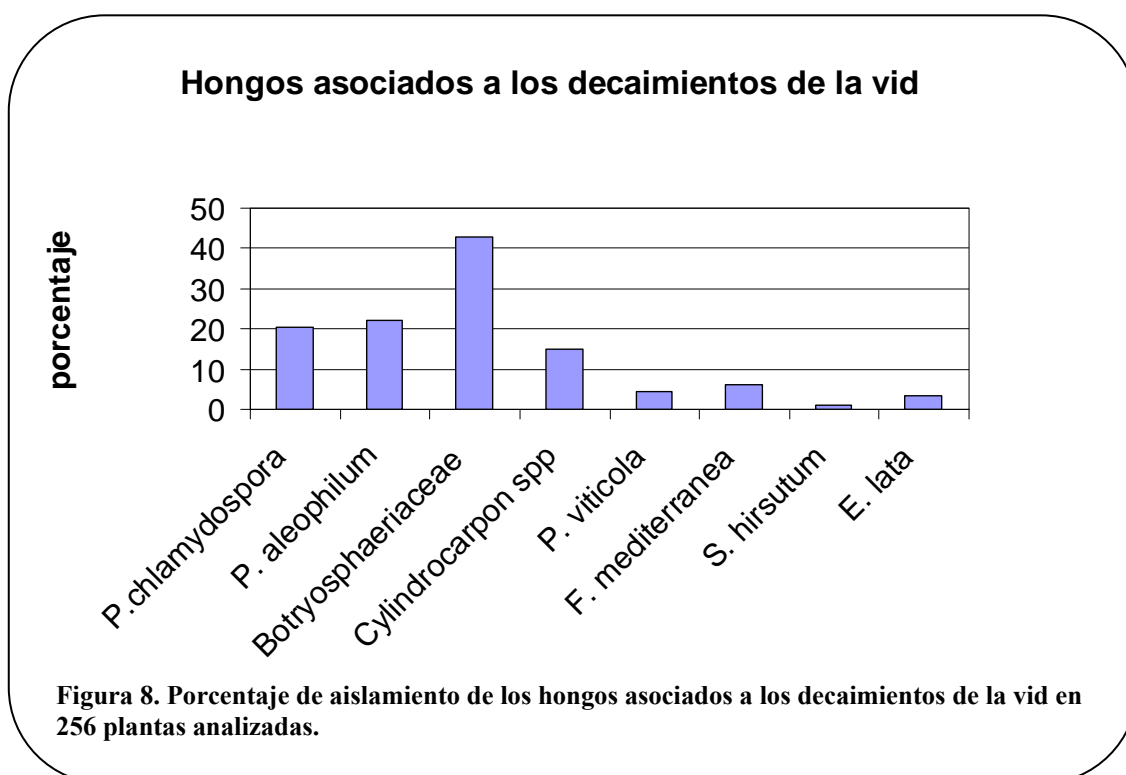


Como dato significativo podemos destacar el alto porcentaje de Eutipiosis en la denominación de origen Toro tanto en 2006 como en 2007 en torno al 14%, mientras que el porcentaje de Yesca en esa denominación se sitúa en torno al 1%. Algo similar ocurre en la denominación de origen Cigales cuyo porcentaje de Eutipiosis es mucho mayor que el de Yesca tanto en 2006 como en 2007.

Conviene señalar que las parcelas muestreadas en el año 2007, correspondientes a la denominación de origen Ribera de Duero, no coincidieron con las muestreadas en 2006 debido a las condiciones meteorológicas acaecidas durante ese año.

## 2. Identificación de los hongos aislados

De las 256 plantas analizadas en el laboratorio de hongos de la vid del departamento de viticultura del Itacyl se han obtenido un total de 734 aislados entre los cuales los miembros de la familia Botryosphaeriaceae han sido los hongos mayoritarios, presentes en el 43% de las cepas analizadas (Figura 8), seguidos por *P. aleophilum* que han sido aislados en el 22% de las cepas analizadas, *P. chlamydospora* en el 20% y *Cylindrocarpon spp.* en el 15%, mientras que *P. viticola* (4%), *F. mediterranea* (6%), *S. hirsutum* (1%) y *E. lata* (3%) pueden considerarse hongos minoritarios puesto que su aislamiento fue esporádico.

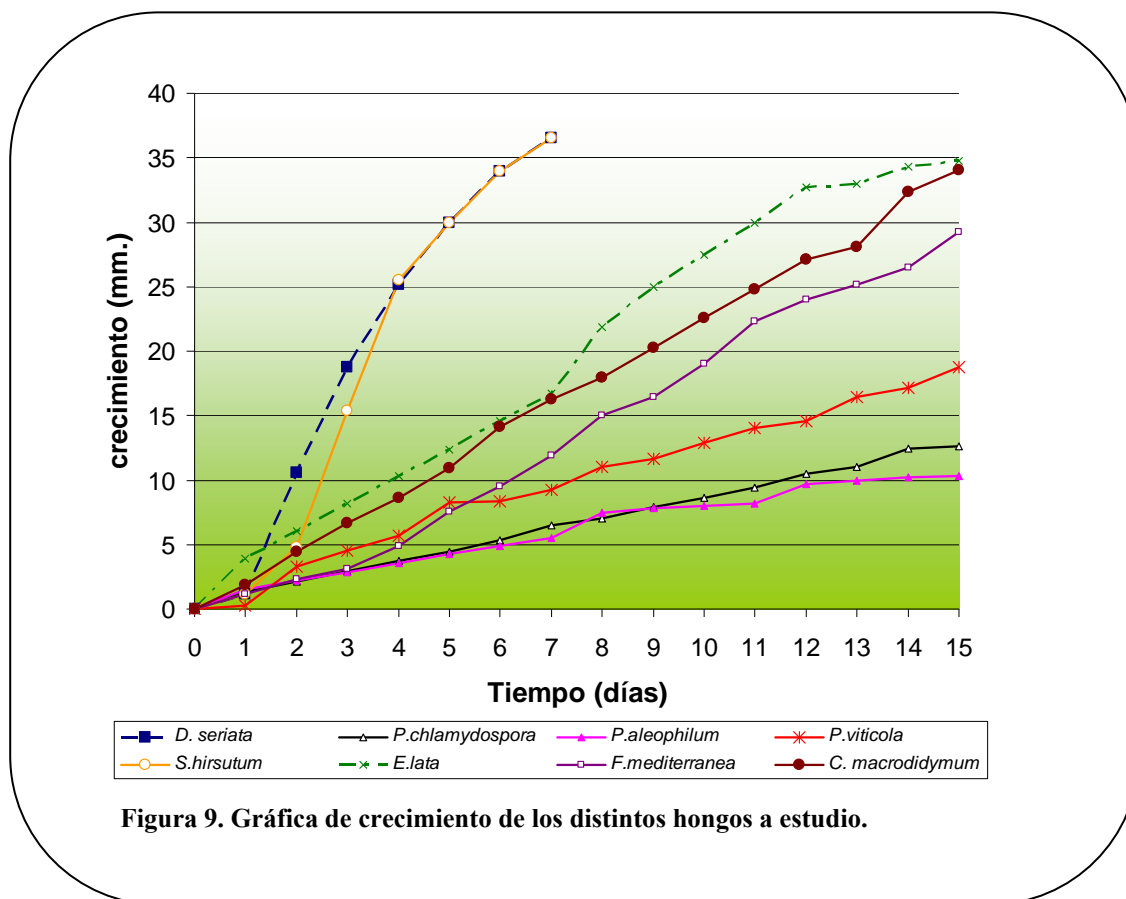


Centrándonos en las especies asociadas a los decaimientos de la vid, de las 256 plantas analizadas se detectaron un total de 296 aislados de los que el 87% pertenecieron a lo que hemos denominado especies mayoritarias: *Botryosphaeriaceae* (37%), *P. aleophilum* (19%), *P. chlamydospora* (18%) y *Cylindrocarpon spp.* (13%) por lo que a lo largo del presente trabajo se hará más hincapié en la detección y caracterización de estas especies.

La determinación de las especies de *Botryosphaeriaceae* y de *Cylindrocarpon* aisladas no fue posible realizarla de forma definitiva en base a características morfológicas por lo que se recurrió a técnicas moleculares, punto al que se hace referencia en el capítulo II de esta memoria.

### 3. Tasa de crecimiento

El estudio del ritmo de crecimiento de los hongos en condiciones *in vitro* puede dar una idea del comportamiento de éstos en la planta. El hecho de que varios de los hongos implicados en los decaimientos coexistan en la misma planta hace pensar que aquellos cuyo desarrollo sea más lento puedan quedar enmascarados por otros de desarrollo más rápido. Se realizó un seguimiento del ritmo de crecimiento de los distintos hongos a estudio (Figura 9) observándose que los hongos que crecen más rápido son *D. seriata* y *S. hirsutum* colonizando toda la placa en 7 días, seguidos de *E. lata* y *C. macrodidymum* que tardan aproximadamente 15 días; *F. mediterranea* no llega a colonizar la placa en ese tiempo al igual que el resto de las especies estudiadas. *P. viticola* posee un menor ritmo de crecimiento seguido de *P. aleophilum* y *P. chlamydospora* que son las especies de crecimiento más lento.



Tras medir el crecimiento de cada uno de los aislados cada 24 horas se estimó la tasa de crecimiento radial correspondiente al día en que se observó el máximo incremento en el crecimiento, obteniéndose los datos que se reflejan en la Tabla 3. Según los datos reflejados en la tabla *S. hirsutum* fue la especie que presentó mayor tasa

de crecimiento radial (10,6 mm/día) alcanzada a las 72 horas de cultivo (tasa media de 5,2 mm/día), seguido de *D. seriata* que presentó una tasa de crecimiento similar. *E. lata* y *C. macrodidymum* presentaron una tasa de crecimiento intermedia (tasa media de 2,3 y 2,2 mm/día respectivamente), seguidos por *F. mediterranea* (1,9 mm/día) y *P. viticola* (1,2 mm/día). Por último *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* presentaron tasas de crecimiento muy bajas (tasa media de 0,8 y 0,6 mm/día respectivamente).

Aislado	Tasa máxima de crecimiento radial (mm/día)	día	Tasa media (mm/día)
<i>D. seriata</i>	9,3	2	5,2
<i>P. chlamydospora</i>	1,38	14	0,8
<i>P. aleophilum</i>	1,95	8	0,6
<i>C. macrodidymum</i>	4,2	14	2,2
<i>S. hirsutum</i>	10,6	3	5,2
<i>F. mediterranea</i>	2,55	10	1,9
<i>P. viticola</i>	3	2	1,2
<i>E. lata</i>	5,2	8	2,3

Tabla 3. Tasa de crecimiento de 8 de las especies asociadas a los decaimientos de la vid.

## Discusión

Desde la prohibición del uso del arsenito sódico en julio de 2003 se ha producido un aumento de las enfermedades englobadas bajo el nombre de decaimientos de la vid. Los muestreos realizados durante los dos últimos años en distintas parcelas de Castilla y León arrojan datos preocupantes, alcanzando porcentajes del 10% de incidencia en 2007. Esta situación no resulta nada esperanzadora si se tiene en cuenta que hasta hoy no existe ningún producto eficaz para la prevención y tratamiento de las cepas afectadas.

En contra de lo que cabría esperar, dado que los hongos aislados en plantas con síntomas de Eutipiosis también aparecen en plantas con síntomas de Yesca, no existe una relación directa entre la incidencia de ambas enfermedades: mientras que los índices de Eutipiosis más elevados se dieron en parcelas de la denominación de origen Toro, esas mismas parcelas registraron los índices más bajos de Yesca.

La identificación en base a características morfológicas no permite una discriminación definitiva entre especies, por lo que es necesario recurrir a métodos moleculares que confirmen una primera identificación morfológica. A pesar de ello, los hongos mayoritariamente aislados de cepas con síntomas de enfermedades de la madera producidas por hongos fueron distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae, seguidos de aislados de *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y distintas especies del género *Cylindrocarpon*. Todos estos aislados constituyeron el 87% de las especies asociadas a los decaimientos de la vid detectadas en las plantas analizadas. En menor porcentaje también fueron detectados *F. mediterranea*, *P. viticola*, *E. lata* y *S. hirsutum*, todos ellos descritos como especies asociadas a los decaimientos de la vid.

En cuanto a las especies implicadas en cada una de las enfermedades no se ha podido establecer una relación directa entre los síntomas y los hongos detectados puesto que en plantas con síntomas evidentes de Eutipiosis el hongo descrito como responsable de la enfermedad ha sido aislado en escasas ocasiones mientras que se aislaron mayoritariamente especies de Botryosphaeriaceae, *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y distintas especies del género *Cylindrocarpon*.

El estudio del ritmo de crecimiento de estos aislados evidenció que existen diferencias notables entre las especies implicadas, pudiéndose considerar tres grupos: hongos de crecimiento rápido entre los que se encuentran *D. seriata* (miembro de la familia Botryosphaeriaceae) y *S. hirsutum*; un segundo grupo de ritmo de crecimiento

intermedio que incluiría a *E. lata*, *C. macrodidymum* y *F. mediterranea*; y un tercer grupo de crecimiento mucho más lento formado por *P. viticola*, *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*. Estas diferencias tan notables en el ritmo de crecimiento pueden provocar que hongos de crecimiento lento se vean invadidos por hongos de crecimiento más rápido. Según Dubos y col. (1988), la enfermedad conocida como Yesca está ocasionada por unos hongos pioneros (*P. aleophilum* y *P. chlamydospora*) que facilitarían la posterior entrada de otros hongos descomponedores (*F. mediterranea* y *S. hirsutum*). Esta teoría de una infección en dos fases vendría avalada por los datos presentados, ya que los hongos pioneros de crecimiento más lento, de no penetrar con anterioridad en la planta, habrían sido invadidos por los hongos de crecimiento más rápido, lo que dificultaría su detección. En cambio, tanto *P. chlamydospora* como *P. aleophilum* forman parte de los hongos mayoritariamente aislados.





Capítulo II

**Identificación molecular de los  
hongos asociados**

Estudio de sus relaciones filogenéticas



## Introducción

Hasta hace pocos años la identificación de los hongos se realizaba por métodos clásicos a partir de la observación del color del micelio en placa, su textura, y la observación al microscopio de las estructuras características de cada especie, así como la morfología de esporas y células conidiógenas. Esta metodología además de ser lenta, en la mayoría de las ocasiones no permite una clasificación definitiva de los hongos, ya que muchas especies poseen características tan similares que les hacen ser morfológicamente indistinguibles. Por otro lado, una misma especie puede adoptar distintas morfologías en un mismo medio de cultivo en función de condiciones no siempre controlables (Figura 16 Introducción general). En abril de 1983 el Dr. Kary Mullis dio a conocer la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis, 1986), descubrimiento por el cual obtuvo el premio Nobel de Química en 1993. Desde entonces hasta nuestros días han sido muchas las aplicaciones de esta técnica lo que ha permitido el desarrollo de la Biología Molecular. La PCR ha proporcionando una herramienta imprescindible para la identificación molecular de hongos y ha permitido el estudio filogenético de cada aislado posibilitando su clasificación definitiva dentro de las distintas especies.

La amplificación de fragmentos de ADN *in vitro* mediante PCR consiste en la repetición de ciclos de síntesis del ácido nucleico a partir de una molécula molde (en este caso ADN del hongo patógeno), mediante el uso de una polimerasa termoestable y una pareja de oligonucleótidos sintéticos que actúan como iniciadores específicos de la reacción (Saiki y col., 1988). El sistema reconoce específicamente una secuencia del organismo, produciendo la amplificación de un fragmento de ADN de tamaño conocido únicamente cuando existe ADN de ese organismo en la muestra.

Uno de los fragmentos más utilizados a lo largo de los años para estudiar las relaciones filogenéticas existentes entre distintos aislados de hongos es la región que codifica los ARNs ribosómicos (ADNr) (White y col, 1990). El ADNr se caracteriza por presentar zonas con una evolución desigual en sus secuencias, por lo que constituye un blanco idóneo sobre el que diseñar oligonucleótidos para identificar hongos situados en distintos niveles taxonómicos. Las regiones que codifican los ARNs 5,8S y 18S (Figura 2, Materiales y métodos), presentan una tasa de evolución baja y se emplean para el estudio filogenético de organismos genéticamente distantes. La región que codifica el ARN 28S muestra una tasa de evolución más alta, con algunas regiones concretas de

mayor variabilidad, lo que permite establecer diferencias a nivel de especie. Por último las regiones existentes entre estos genes, regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*InterGenic Spacer*) son las que evolucionan más rápidamente y se utilizan en el análisis de especies próximas e incluso de variedades dentro de la misma especie. La homología intraespecífica existente en la región ITS ha facilitado el diseño de oligonucleótidos específicos que reconocen el ADN de un determinado patógeno, lo que ha permitido realizar considerables avances en la detección de enfermedades. Existen numerosos cebadores que reconocen específicamente muchas de las especies asociadas a los decaimientos de la vid, facilitando su identificación:

- Pch1 y Pch2 (Tegli y col. 2000) y PCL1 y PCL2 (Groenewald y col. 2000) reconocen específicamente ADN de *Phaeoconiella chlamydospora*.

- Pal1N y Pal2 (Tegli y col. 2000) diseñados para reconocer ADN de *Phaeoacremonium aleophilum*, se ha demostrado que a su vez reconocen otras especies del género *Phaeoacremonium*. Recientemente Aroca y Raposo (2007) diseñaron una nueva metodología para la discriminación entre las distintas especies de *Phaeoacremonium*, basada en la amplificación de un fragmento de 415 pb de la región ITS con los cebadores Pm1 y Pm2. Mediante la restricción del fragmento amplificado con endonucleasas (*Bss*KI, *Eco*O109I y *Hha*I) pudieron identificar patrones específicos para 9 de las 13 especies de *Phaeoacremonium* descritas en vid.

- Dest1 y Dest4 (Hamelin y col., 1996) reconocen distintas especies del género *Cylindrocarpon*. En un principio fueron diseñados para detectar *C. destructans*, pero los avances en estudios filogenéticos han permitido la reubicación de distintas especies por lo que según la clasificación taxonómica actual reconocen *Neonectria radicola* (*C. destructans*), *N. macrodydima* (*C. macrodydimum*) y *N. liriodendri* (*C. liriodendrum*).

- CylF y CylR (Dubrovsky y Fabritius, 2007) diseñados para reconocer específicamente *C. liriodendri* y *C. macrodydimum*.

- Lata1 y lata2.2 (Lecomte y col., 2000) que reconocen aislados de *E. lata*.

Además de los mencionados anteriormente, Pollastro y colaboradores (2001) diseñaron cebadores específicos para la detección de *P. chlamydospora*, *F. mediterranea* y *P. viticola* a partir de marcadores RAPD.

El principal problema al que nos enfrentamos al abordar las especies implicadas en las enfermedades de la madera es que cada una de ellas se debe a un conjunto de hongos. En el caso de la enfermedad de Petri, como ya se mencionó en el Capítulo I de esta memoria, principalmente están involucradas dos especies: *P. chlamydospora* y *P.*

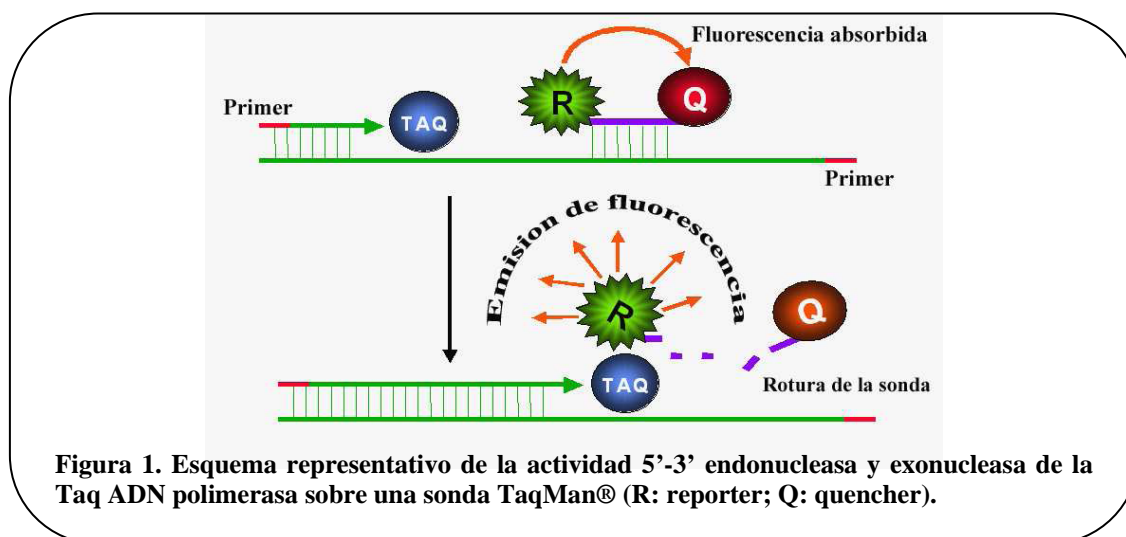
*aleophilum*. Para disminuir el tiempo necesario para la identificación de estas especies en cepas con síntomas de enfermedades de la madera, se puso a punto un sistema de PCR múltiple que permite detectar en una única reacción la presencia de *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*, a partir de los oligonucleótidos iniciadores ya mencionados (Pch1/2 y Pal1N/2).

En el caso de las especies de Botryosphaeriaceae, Alves y col. (2005) amplificaron un fragmento de 1200pb de la región ITS con los oligonucleótidos iniciadores ITS1 (White y col., 1990) y NL4 (O'Donell, 1993), y sometándolo a restricción con distintas endonucleasas, establecieron distintos patrones de bandas característicos de cada especie. De esta forma hemos conseguido identificar todos los aislados pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae.

Para la identificación de aquellas especies para las que no se disponía de cebadores específicos se recurrió a secuenciar un fragmento de aproximadamente 650 pb amplificado con los oligonucleótidos ITS4 e ITS5 (en basidiomicetos alrededor de 800 pb) y la secuencia obtenida se comparó con las secuencias presentes en la base de datos GenBank lo que permitió una identificación más fidedigna. Realizando un alineamiento múltiple con las secuencias obtenidas a partir del fragmento amplificado con los iniciadores ITS4 e ITS 5 (White y col., 1990) de cada una de las especies a estudio se realizó un dendrograma que permitió poner de manifiesto las relaciones filogenéticas existentes entre las distintas especies implicadas.

En 1992 Higuchi y col., introdujeron una modificación de la PCR convencional, posibilitando la amplificación y detección simultánea de secuencias de ADN específicas mediante la adición de bromuro de etidio a la reacción. La fluorescencia emitida por unión del bromuro de etidio era proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena presente en el tubo de reacción, que podía ser monitorizado para seguir el proceso en tiempo real. El año siguiente publicaron una nueva técnica conocida como PCR cinética o PCR a tiempo real (Higuchi y col., 1993). Además del bromuro de etidio, actualmente se han desarrollado fluoróforos capaces de excitarse y por tanto de emitir fluorescencia. Algunos como el SYBR<sup>®</sup> Green I son inespecíficos y, al igual que el bromuro de etidio, se une al ADN emitiendo una fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena presente en la muestra (Wittwer y col., 1997). Otros sistemas incorporan sondas específicas homólogas a una secuencia interna a la amplificada por los dos cebadores. Las sondas específicas pueden clasificarse en sondas de hidrólisis y sondas de hibridación.

Las *sondas de hidrólisis* son digeridas durante la fase de extensión de los cebadores por la acción exonucleasa 5'-3' de ciertas polimerasas (Holland y col., 1991), produciéndose en ese momento la emisión de fluorescencia. Entre este tipo de sondas destacan las TaqMan® y las sondas TaqMan® MGB (*Minor Groove Binder*), ambas desarrolladas por Applied Biosystems. Están marcadas en sus extremos con dos fluorocromos, el del extremo 5' denominado *reporter* o donador de electrones, emite fluorescencia y ésta puede ser captada por el fluorocromo anclado en el extremo 3', que se denomina *quencher* o aceptor de electrones, cuando la distancia que existe entre ambos es inferior a 10 nm. Hoy en día existen *quencher* que no emiten señal fluorescente y se denominan “*quencher* no fluorescente” (NFQ) o *quencher* oscuro, provocando, por tanto, un ruido de fondo menor que favorece la exactitud y precisión de los resultados. Durante la fase de hibridación de cada ciclo de PCR, la sonda se une a su secuencia diana situada entre los dos cebadores. Cuando la polimerasa empieza a extender las cadenas de ADN se encuentra con la sonda y la digiere debido a su actividad 5'-3' exonucleasa. La degradación de la sonda permite que se liberen los nucleótidos y ambos fluorocromos que la formaban, quedando éstos en la solución a una distancia superior a la necesaria para que se produzca transferencia de energía, por lo que se produce emisión de fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de *reporter* liberado (Heid y col., 1996) (Figura 1). Las sondas MGB son similares a las sondas TaqMan®, pero presentan la particularidad de unirse al surco menor del ADN, lo que favorece la estabilidad y especificidad de la hibridación (Kutyavin y col., 2000). Esto permite el diseño de sondas de menor tamaño (entre 13 y 20 pb) particularmente en el caso de secuencias ricas en A y T, en las que las sondas TaqMan® presentarían una longitud excesiva. Este hecho favorece un diseño más versátil de los sistemas RTi-PCR.



Las *sondas de hibridación*, por el contrario, no sufren un proceso de hidrólisis durante cada ciclo de PCR, y la fluorescencia se origina durante la fase de hibridación, en la cual se produce una relajación de su estructura que permite una separación suficiente del *reporter* respecto del *quencher* para que se produzca emisión de fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de ADN sintetizado. Entre ellas destacan:

- Sondas FRET (Witwer y col., 1997). Se trata de dos sondas de secuencias específicas, una marcada en su extremo 3' y la otra en su extremo 5' con dos fluorocromos diferentes. Estas dos sondas hibridan adyacentemente en la secuencia diana de modo cabeza con cola. Cuando ambas están juntas, la fluorescencia producida por la estimulación de la fuente en uno de los fluorocromos, induce la fluorescencia del otro situado en la segunda sonda mediante el fenómeno de transferencia de energía.

- *Molecular Beacon* (Tyagi y Kramer, 1996). Se trata del tipo más simple de sondas que forman un *hairpin* u horquilla. Presentan un bucle homólogo a la secuencia que se desea amplificar y que está flanqueado por dos secuencias complementarias entre si, generalmente de 3 a 6 pb, que cierran la horquilla. En cada extremo de la sonda existe, además, un *quencher* y un *reporter*. Cuando la molécula está en solución, la horquilla está cerrada, de manera que éstos están situados próximos, no detectándose fluorescencia. Durante la fase de desnaturalización, en cada ciclo de PCR, las secuencias complementarias que cierran la horquilla se separan, relajándose la estructura. En la fase posterior de hibridación, la sonda *Molecular Beacon* se unirá a su secuencia homóloga manteniéndose su estructura desdoblada, con lo que el *reporter* se encuentra separado del *quencher* a una distancia superior a la necesaria para que se transmita la energía. Consecuentemente, la fluorescencia emitida será proporcional a la cantidad de *reporter* libre, es decir, a la cantidad de ADN sintetizado.

- Sondas Scorpion™ (Whitcombe y col., 1999) son oligonucleótidos formados por un cebador con una región funcional y una extensión en forma de horquilla en el extremo 5'. El bucle de la horquilla está formado por la secuencia complementaria a la diana. En el extremo 5' se encuentra el fluorocromo *reporter* y en el extremo 3' el *quencher*, en este punto del extremo 3' se une a la zona funcional de la sonda que consiste en un cebador complementario a nuestra secuencia. Se une mediante un monómero que impide la extensión denominado bloqueador de la PCR. Este cebador se une durante la fase de hibridación a la diana y durante la extensión la sonda Scorpion™ se despliega

completamente para unir también la secuencia de la horquilla, separando el *reporter* y el *quencher* y emitiéndose por tanto fluorescencia.

La RTi-PCR permite monitorizar la amplificación a lo largo del tiempo mediante detección de fluorescencia en un tubo cerrado sin interferir con la reacción. Esto permite una serie de ventajas (Schmittgen, 2001):

- a) La capacidad de generar resultados entre 30 min y 3 horas, dependiendo del tipo de termociclador.
- b) Mayor sensibilidad que las PCR convencionales.
- c) Posibilidad de automatización a gran escala de la metodología.
- d) Menor riesgo de contaminación ya que no requiere manipulación post-PCR.
- e) Menor variación en los resultados.

Una primera aproximación de esta técnica aplicada a la detección de *P. chlamydospora* fue publicada por Overton y col (2004). En ese trabajo se diseñaron dos oligonucleótidos iniciadores específicos para *P. chlamydospora* que amplificaban un fragmento de 320 pb utilizando PCR a tiempo real con SYBR<sup>®</sup> Green. Posteriormente la técnica ha sido mejorada por Edwards y col. (2007), mediante la aplicación de PCR a tiempo real con tecnología TaqMan<sup>®</sup>. Con este sistema son capaces de amplificar un fragmento de 197 pb, utilizando como material de partida muestras de agua recogidas de invernadero. En este trabajo a pesar de obtener unos límites de detección buenos (10 esporas/ml), los datos no se repiten en los tres replicados realizados y los coeficientes de correlación obtenidos en la curva patrón realizada para la cuantificación de esporas son bajos ( $R^2=0.73449$ ). En la presente memoria se diseñaron dos cebadores específicos y una sonda TaqMan<sup>®</sup> para la detección de *P. chlamydospora* mediante RTi-PCR con el objeto de mejorar la sensibilidad de los sistemas propuestos anteriormente.



## Materiales y métodos

### 1. Inoculación de material vegetal para ensayos *in vitro*

La inoculación de sarmientos para la detección de hongos a partir de muestras vegetales, se realizó según el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos del capítulo IV.

### 2. Obtención de ADN genómico

Se optimizó el método de extracción de ADN en función de la calidad y cantidad necesaria para cada uno de los ensayos:

#### 2.1. extracción rápida para identificación de especies

Las extracciones de ADN se realizaron a partir de micelio fresco crecido en placa Petri a 25° C en medio PDA, utilizando REDExtract-N-Amp Kit (XNAP) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente se realizó la amplificación con el mismo Kit.

#### 2.2. extracción de ADN a partir de material vegetal inoculado

Las extracciones de ADN a partir de material vegetal se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Tegli y col., (2000a) incubando 3 astillas en 5 ml de medio líquido (extracto de malta) durante un período de 3-5 días en agitación. Se centrifugó el micelio de 1 ml de cultivo y se extrajo el ADN del precipitado mediante REDExtract-N-Amp Kit (XNAP) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA).

### 3. Análisis mediante PCR

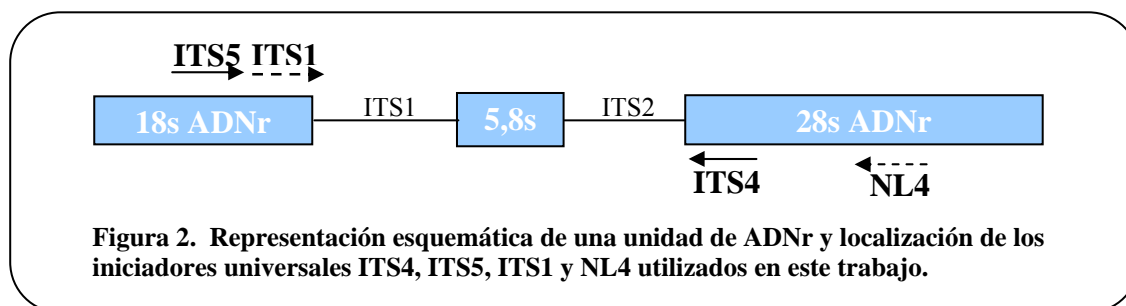
Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos iniciadores fueron suministrados por la firma comercial IZASA (Barcelona, España). Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE.

#### 3.1. Amplificación con cebadores universales

Para la amplificación y posterior secuenciación de los aislados, se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores universales ITS4 e ITS5 (White y col., 1990). La mezcla de

la reacción se preparó en un volumen final de 30 µl utilizando 1× REDEExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores ITS5 (sentido) (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS 4 (antisentido) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), y aproximadamente 50 ng de ADN fúngico (Figura 2). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 1 minuto, hibridación a 58° C durante 1 minuto y extensión a 72° C durante 1 minuto, concluyendo con un paso de extensión final a 72° C durante 10 minutos.

La identificación de las distintas especies de Botryosphaeriaceae se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos iniciadores ITS 1 (White y col., 1990) y NL4 (O'Donell, 1993) que amplifican la región ITS1, el ADNr 5,8S, la región ITS2 y los dominios D1/D2 del ADN ribosómico 28S. La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 20 µl utilizando 1× REDEExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores ITS1 (sentido) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y NL4 (antisentido) (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), y de 50-100 ng de ADN fúngico (Figura 2). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, hibridación a 50° C durante 30 segundos y extensión a 72° C durante 1 minuto, concluyendo con un paso de extensión final a 72° C durante 10 minutos.



### 3.2. Amplificación con cebadores específicos

#### 3.2.1. Identificación específica de aislados de *P. chlamydospora*

Para la identificación de los aislados de *P. chlamydospora* se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores Pch1 y Pch2 (Tegli y col., 2000). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 25 µl conteniendo tampón de PCR 1×, preparado a partir de tampón 10× proporcionado con la enzima, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200

μM de dNTPs, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España), 0,5 μM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores Pch1 (sentido) (5'-CTCCAACCCT TTGTTTATC-3') y Pch2 (antisentido) (5'-TGAAAGTTGATATGGACCC-3'), y aproximadamente 50 ng de ADN genómico. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 ° C durante 1 minuto, hibridación a 62 ° C durante 1 minuto y extensión a 72 ° C durante 1 minuto, concluyendo con un paso de extensión final a 72 ° C durante 5 minutos.

### 3.2.2. Identificación específica de aislados de *P. aleophilum*

Para la identificación de los aislados de *P. aleophilum* se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores Pal1N y Pal2 (Tegli y col., 2000). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 25 μl conteniendo tampón de PCR 1×, preparado a partir de tampón 10× proporcionado con la enzima, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España), 0,5 μM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores Pal1N (sentido) (5'-AGGTCGGGGGCCAAC-3') y Pal2 (antisentido) (5'-AGGTGTAACTACTGCGC-3'), y aproximadamente 50 ng de ADN genómico. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 1 minuto, hibridación a 65° C durante 1 minuto y extensión a 72° C durante 1 minuto, concluyendo con un paso de extensión final a 72° C durante 5 minutos.

### 3.2.3. Identificación específica de aislados de *Cylindrocarpon* spp.

Para la identificación de los aislados de *Cylindrocarpon* spp. se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores Dest1 y Dest4 (Hamelin y col., 1996) o CylF y CylR (Dubrovsky y Fabrititus, 2007). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 25 μl conteniendo tampón de PCR 1×, preparado a partir de tampón 10× proporcionado con la enzima, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España), 0,5 μM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores Dest1 (sentido) (5'-TTGTTGCCTCGGCGGTGCCTG-3') y Dest4 (antisentido) (5'-GGTTTAACGGCGTGGCCGCGCTGTT-3') y aproximadamente 50 ng de ADN genómico. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 1 minuto, hibridación a 61° C durante 1 minuto y

extensión a 72° C durante 1 minuto, concluyendo con un paso de extensión final a 72° C durante 7 minutos.

La amplificación con los cebadores CylF (sentido) (5'-CCAAACCCC TGTGAACATAC-3') y CylR (antisentido) (5'-TGTGCTACTACGCAGAGGAA-3') se llevó a cabo en las mismas condiciones que con los cebadores Dest1 y Dest4 pero realizando la hibridación de los cebadores a 56° C.

### 3.2.4. Identificación específica de aislados de *E. lata*

Para la identificación de los aislados de *E. lata* se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores lata1 y lata 2.2 (Lecomte y col., 2000). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 25 µl conteniendo tampón de PCR 1×, preparado a partir de tampón 10× proporcionado con la enzima, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España), 0,5 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores lata1 (sentido) (5'- GAGCTACCCTG TAGCCCGCTG -3') y lata2.2 (antisentido) (5'- GACGTCAGCCGTGACACACC -3'), y aproximadamente 50 ng de ADN genómico. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 94° C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, hibridación a 67° C durante 30 segundos y extensión a 72° C durante 1 minuto, concluyendo con un paso de extensión final a 72° C durante 5 minutos.

## 4. Electroforesis en geles de agarosa

La separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU). El gel se preparó en tampón TBE 1× fundiendo la agarosa (1% p/v) en microondas. Posteriormente, se enfrió hasta 50° C y se dejó solidificar en la bandeja de electroforesis. Se tomó una alícuota de cada fragmento amplificado a los que se añadió tampón de carga 6× (5:1), suministrado junto con el marcador de peso molecular PCR Marker 50-2.000 pb (Sigma). La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE 1× aplicando un voltaje de 100 mV. Los geles se incubaron durante 15 minutos en una solución de bromuro de etidio (0,2 ng/ml). Los fragmentos amplificados se visualizaron por iluminación con luz ultravioleta y se fotografiaron (gelDoc 1000 Bio-Rad).

**Tampón TBE 10×:** pesar 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y añadir 40 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0, completar con agua destilada hasta un volumen de un litro y finalmente ajustar el pH si fuese necesario a 8,3.

## **5. Purificación de los fragmentos amplificados**

Para la identificación de aquellos aislados de los que no se dispone de oligonucleótidos iniciadores específicos, se recurrió a purificar y posteriormente secuenciar los fragmentos amplificados. Una vez comprobado, mediante electroforesis, el éxito de la amplificación los fragmentos en solución se purificaron con GFX PCR DNA Purification kit (Amersham Biosciences GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) para su posterior secuenciación, siguiendo las instrucciones del proveedor.

## **6. Cuantificación de ácidos nucleicos**

La concentración del ADN extraído así como de los fragmentos amplificados y purificados se cuantificó midiendo la densidad óptica a una absorbancia de 260 nm con NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware Estados Unidos). La calidad del ADN se determinó por medida de la relación entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm considerándose preparaciones puras valores cuyo cociente fue próximo a 1,8.

## **7. Secuenciación**

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Para la reacción de secuenciación se utilizó DYEnamic ET Dye Terminator kit (MegaBACE, Amersham). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC-200. Los fragmentos de ADN se analizaron en un secuenciador MegaBACE 500 (Amersham). Las secuencias obtenidas fueron editadas con Chromas v 1.45 (Conor McCarthy, School of Health Sciences Griffith University, Southport, Australia), y se realizó un BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) para establecer la especie con la que compartían mayor homología, considerando una identificación definitiva cuando los porcentajes de homología estaban comprendidos entre el 98 y el 100%.

## **8. Relaciones filogenéticas**

Se secuenciaron los amplicones ITS4-5 de los hongos asociados a los decaimientos de la vid aislados a partir de las 256 plantas utilizadas en este trabajo. Para el estudio de las relaciones filogenéticas existentes entre los distintos géneros implicados, se eligieron cinco secuencias representativas de cada una de las especies y se incluyó una

secuencia de cada especie procedente de la base de datos GenBank: *Phaeomoniella chlamydospora* AF266653, *Phaeoacremonium aleophilum* AF197983, *Neonectria macrodidyma* DQ093687.1, *Cylindrocarpon liriodendri* DQ178163.1, *Neonectria radiculicola* AY997532.1, *Diplodia seriata* AY662397.1, *Diplodia mutila* AY972107.1, *Botryosphaeria dothidea* DQ177876.1, *Neofusicoccum parvum* AY236944.1, *Dothiorella sarmentorum* AY573208.1, *Dothiorella iberica* AY573216.1, *Dothiorella viticola* EF445361.1, *Eutypa lata* AY787699.1, *Phomopsis viticola* AY485784.1, *Fomitiporia mediterranea* AY849303.1 y *Stereum hirsutum* AY854063.1. El estudio de las relaciones filogenéticas existentes entre los distintos géneros y especies implicadas se realizó mediante comparación de secuencias con el programa Clustal W 2.0.5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y posteriormente se construyó el dendrograma correspondiente al alineamiento mediante el programa MEGA versión 4 (Tamura y col., 2007).

### 9. Identificación de especies de Botryosphaeriaceae por patrones de restricción

Tras la amplificación con los oligonucleótidos iniciadores ITS1 y NL4 (apartado 3.1, Materiales y métodos, Capítulo II), se procedió a la digestión de dicho fragmento con endonucleasas *Bsu*RI, *Taq*I, *Sau*96I (Bioron GmbH, Ludwingshagen, Alemania) y *Alu*I (Biotools Biotechnological and Medical Laboratories S.A, Madrid, España). Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 5 µl del fragmento a digerir, 2U de enzima, y 1× tampón según las instrucciones del proveedor. La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas en un termobloque (Thermomixer comfort eppendorff, Hamburg, Alemania). En el estudio se incluyeron ocho cepas procedentes de la colección de hongos CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda) correspondientes a cada una de las especies de Botryosphaeriaceae asociadas a los decaimientos de la vid, que sirvieron como referencia en los análisis de los patrones de restricción (Tabla 1).

Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 3% usando 1× TBE como tampón y un voltaje constante de 90 mV.

Especie	Número de acceso
<i>Diplodia seriata</i>	CBS 719.85
<i>Diplodia mutila</i>	CBS 43182
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CBS113190
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CBS 110301
<i>Neofusicoccum ribis</i>	CBS 637.77
<i>Neofusicoccum luteum</i>	CBS 110299
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 11011
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	CBS 120.41

**Tabla 1.** Cepas de referencia utilizadas en el estudio de patrones de restricción.

#### 10. Detección de *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* por PCR múltiple

Para la detección de ambos aislados en una única reacción se empleó QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Cologne, Alemania) y los oligonucleótidos iniciadores Pch1 y Pch2 para la detección de *P. chlamydospora* y Pal1N y Pal2 para *P. aleophilum* (Tegli y col., 2000). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 10 µl conteniendo 5 µl de QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 1 µl de Solución Q, 0,24 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 50-100 ng de ADN.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial a 95 ° C durante 15 minutos de activación de la polimerasa (HotStarTaq ADN polimerasa), seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, hibridación a 62 ° C durante 1 minuto y 30 segundos, y extensión a 72 ° C durante 1 minuto y 30 segundos, concluyendo con un paso de extensión final a 72 ° C durante 10 minutos.

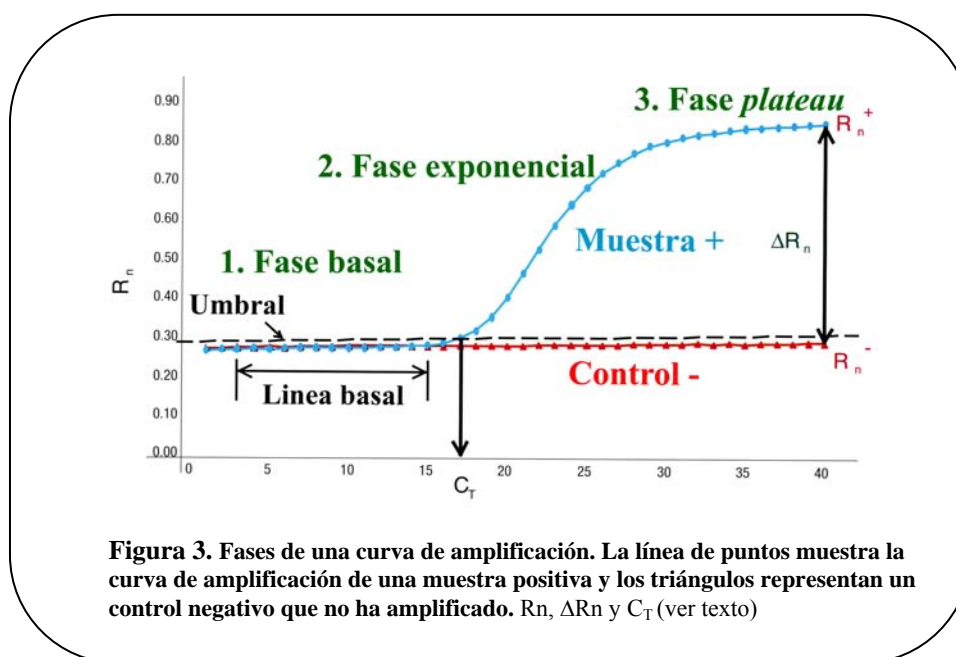
Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 3% usando 1× TBE como tampón y un voltaje constante de 90mV.

#### 11. Detección de *P. chlamydospora* mediante PCR a tiempo real

Para el análisis de los resultados se tuvieron en cuenta una serie de parámetros que se esquematizan en la Figura 3:

La fluorescencia normalizada (**Rn**) es el cociente entre la fluorescencia que emite el *reporter* y la emitida por la referencia pasiva (ROX). En el tampón de PCR

generalmente se encuentra en dilución un fluorocromo denominado ROX que emite fluorescencia por igual en todos los pocillos y permite así normalizar aquellas posibles variaciones ocasionadas durante el pipeteo. El  $\Delta R_n$ , es la diferencia entre  $R_n$  y la fluorescencia detectada en la línea basal. El incremento de fluorescencia normalizada ( $\Delta R_n$ ) durante la fase exponencial es directamente proporcional a la concentración de ADN. La línea basal está formada por el intervalo de ciclos de PCR en los que no se detecta un incremento exponencial de fluorescencia pero sí que podemos detectar una fluorescencia de fondo que varía en cada experimento, con lo que la línea basal se puede fijar manualmente; por defecto se establece entre el primer ciclo y el ciclo anterior al que se detecta un incremento exponencial de fluorescencia. El ciclo umbral o  $C_T$  (*threshold cycle*) es el ciclo de PCR en el cual el incremento de la fluorescencia del *reporter* se produce por encima de la línea basal y alcanza un umbral preestablecido. El umbral (*threshold*) viene establecido por defecto por  $\times 10$  SD de la fluorescencia que se observa durante los ciclos que forman la línea basal, pero puede ser modificado dependiendo del criterio que establezcamos.



Se diseñó un sistema de RTi-PCR para la detección de *P. chlamydospora*. El método fue puesto a punto utilizando la química SYBR<sup>®</sup> Green para posteriormente optimizarlo usando tecnología TaqMan<sup>®</sup> que aumenta la especificidad y sensibilidad del sistema.



### 11.1. Aislados de *P. chlamydospora* utilizados

Para el diseño y puesta a punto del sistema de RTi-PCR se utilizaron 60 aislados de *P. chlamydospora* (Tabla 3): 36 procedían de 26 cepas recogidas de distintas zonas de la Península, durante los años 2004-2006, con edades comprendidas entre 5 y 80 años, y que presentaron síntomas de enfermedades de la madera; 7 aislados procedían de plantas jóvenes de Extremadura con síntomas; 5 aislados fueron obtenidos de plantas de vivero; un aislado fue amablemente cedido por la Dra. R. Raposo (INIA, Madrid); otros 2 aislados, LR9 y LR47, fueron cedidos desinteresadamente por el Dr. J.P. Péros (INRA, Villeneuve-les-Maguelone, Francia); 7 aislados fueron cedidos por el Dr. Pablo García-Benavides (Centro Regional de Diagnóstico de la Junta de Castilla y León, Aldearrubia, Salamanca), y como referencia se incluyeron dos aislados obtenidos del *Centraalbureau voorschimmelcultures* (CBS, Utrecht, Países Bajos).

### 11.2. Diseño de oligonucleótidos y sonda

A partir de la secuenciación del fragmento ITS amplificado con los cebadores ITS5 e ITS4 de 42 aislados de *P. chlamydospora* se realizó un alineamiento utilizando la herramienta bioinformática CLUSTALW, que permitió establecer una secuencia consenso para el diseño del sistema. Los oligonucleótidos y las sondas utilizados para la amplificación (Tabla 2), fueron diseñados con el programa Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), y sintetizados por MWG-Biotech AG (Ebensburg, Alemania). Las sondas TaqMan<sup>®</sup> fueron marcadas en el extremo 5' con el fluorocromo FAM (6-carboxyfluoresceína) como donador de electrones (*reporter*) y en 3' con BHQ1 (black hole quencher 1) como aceptor de electrones (*quencher* no fluorescente).

Región diana	Nombre	Tipo	Secuencia
ITS 1	<i>PchITS36F</i>	Cebador sentido	5'-CCAACCCTTTGTTTATCATACCTTTG-3'
	<i>PchITS118R</i>	Cebador antisentido	5'-TGGCCAGAGGCGACTGA-3'
	<i>PchITS67P</i>	Sonda TaqMan <sup>®</sup>	5'-FAM-TTGGCAGACCCGTCCTTCGGG-BHQ-3'
ITS 2	<i>PchITS417F</i>	Cebador sentido	5'-TGGCGGCGTCAAGAATG-3'
	<i>PchITS495R</i>	Cebador antisentido	5'-CAATAGGGCCAGGCCAAG-3'
	<i>PchITS439P</i>	Sonda TaqMan <sup>®</sup>	5'-FAM-AGGTGCAGCGAGCAATCAAGCATA-BHQ-3'

Tabla 2. Cebadores y sondas utilizadas en este trabajo.

### 11.3. Condiciones de amplificación

El programa de amplificación así como las concentraciones de los reactivos se optimizaron obteniendo las concentraciones que se describen a continuación: 1× TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 µM de cada oligonucleótido, 0,15 µM de la sonda TaqMan® y 5 ng del ADN molde, en un volumen final de 20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 2 min a 50° C, 10 min a 95°C, y 50 ciclos de 15 s a 95° C y 1 min a 60° C.

Los productos de PCR fueron analizados con el programa Sequence Detection System versión 1.2.3 (Applied Biosystems).

### 11.4. Especificidad del sistema RTi-PCR

La especificidad del sistema se comprobó a partir de 60 aislados del *P. chlamydospora* (Tabla 2) y 16 aislados de otras especies de hongos asociados a los decaimientos (*Phaeoacremonium* spp., Botryosphaeriaceae, *Cylindrocarpon* spp., *Stereum hirsutum*, *Eutypa lata* y *Fomitiporia mediterranea*) y 1 especie no patógena de vid (*Alternaria solani*) que se detallan en la Tabla 3. Todos los aislados fueron testados bajo las mismas condiciones de amplificación, y cada uno de los ADN fue previamente amplificado con los cebadores ITS5 e ITS4 para comprobar la viabilidad de la muestra.

### 11.5. Sensibilidad del sistema

La sensibilidad del sistema diseñado se comprobó mediante la determinación del límite de detección (LOD) a partir de distintas concentraciones de ADN de *P. chlamydospora*, así como a partir de diluciones de esporas. En ambos casos se utilizó el aislado de referencia *P. chlamydospora* CBS 239.74. Consideramos el límite de detección (LOD) como la menor concentración a la que se puede detectar un analito en el 95% de las reacciones.

#### 11.5.1. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron con DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Cologne, Alemania), a partir de 40 mg de micelio liofilizado y pulverizado en mortero con nitrógeno líquido. El ADN resultante fue resuspendido en 100 µl de agua milliQ estéril. La concentración del ADN obtenido se midió mediante espectrometría (NanoDrop®).

### 11.5.2. Límite de detección a partir de ADN de *P. chlamydospora*

Se prepararon 11 diluciones de ADN extraído del aislado *P. chlamydospora* CBS 239.74 (concentración de partida 22,83 ng/μl), de manera que cada tubo de reacción contenía 108.000.000; 10.800.000; 1.080.000; 108.000; 10.800; 1.080; 108; 54; 21,6; 10,8 y 1,08 fentogramos de ADN respectivamente. Se realizaron 3 experimentos independientes, en los cuales cada concentración se analizó por triplicado; a excepción de las 4 últimas concentraciones que se analizaron 10 veces en cada ensayo de RTi-PCR.

### 11.5.3. Cuantificación de esporas

Para la obtención de esporas de *P. chlamydospora* se partió de placas de micelio crecido en PDA de aproximadamente 1 mes de crecimiento, a las que se añadió 1 ml de agua milliQ estéril. La placa se agitó para permitir que las esporas se liberasen al agua, y éste fue recogido con pipeta en condiciones estériles. Se procedió al recuento de las esporas obtenidas mediante cámara de Neubauer® (BlauBrand, Alemania) y se estimó la concentración aplicando la fórmula:  $\text{Esporas/ml} = N \times 25 \times 10^4$ , siendo N el número medio de esporas por celdilla.

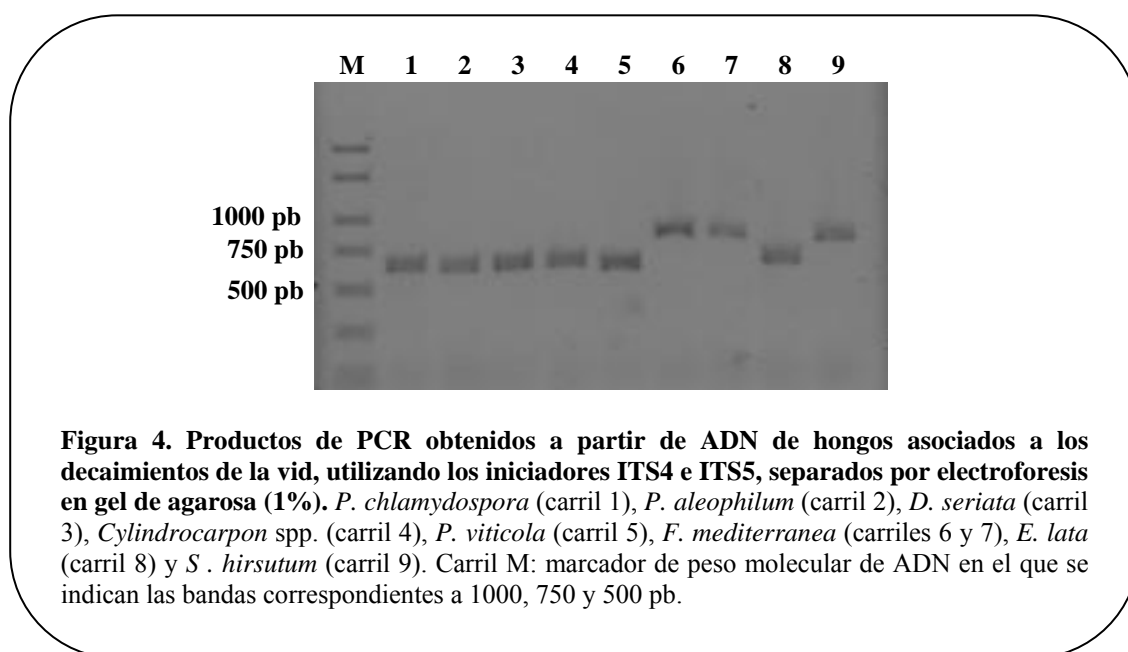
### 11.5.4. Límite de detección a partir de esporas de *P. chlamydospora*

A partir de una suspensión de esporas de *P. chlamydospora* CBS 239.74 a una concentración de  $557,8 \times 10^4$  esporas / ml, se prepararon 9 diluciones, de manera que cada tubo de reacción contenía 27.890, 2.789, 279, 100, 50, 20, 10, 5, y 1 esporas respectivamente. Para cada una de las diluciones se realizaron 3 experimentos independientes, en los cuales cada concentración se analizó por triplicado; a excepción de las 4 últimas concentraciones que se analizaron 10 veces en cada ensayo de RTi-PCR.

## Resultados

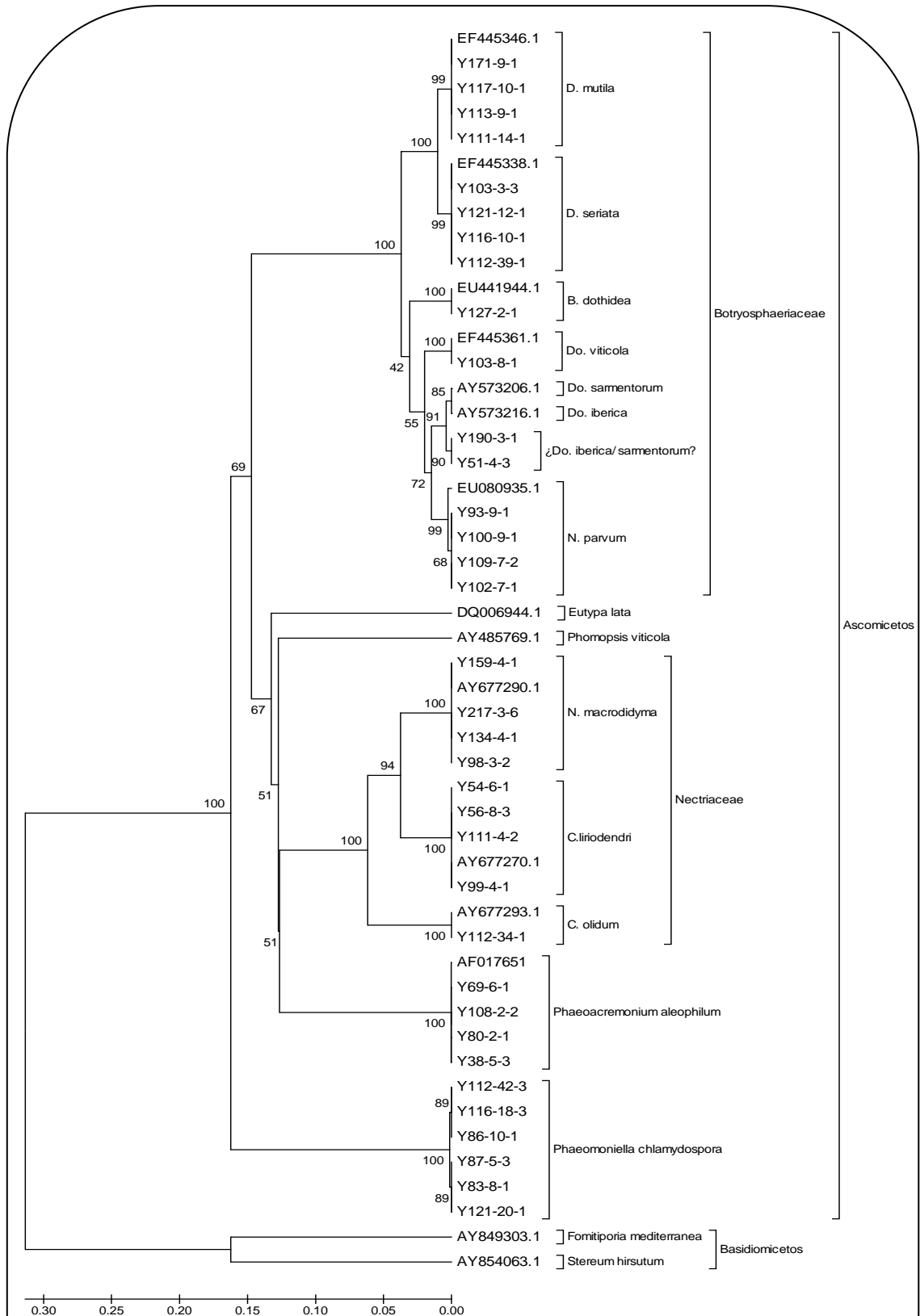
### 1. Filogenia molecular de los hongos asociados a los decaimientos de la vid

La amplificación a partir de los oligonucleótidos iniciadores ITS4 e ITS5 permitió obtener un fragmento de aproximadamente 650 pb en el caso de hongos ascomicetos (*P. chlamydospora*, *P. aleophilum*, *Cylindrocarpon* spp., *P. viticola*, *E. lata*, *D. seriata*, *D. mutila*, *N. parvum*, *B. dothidea*, *Do. sarmentorum*, *Do. iberica* y *Do. viticola*) y de alrededor de 800 pb en especies de hongos basidiomicetos (*S. hirsutum* y *F. mediterranea*) (Figura 4).



La secuenciación de los fragmentos amplificados y posterior comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos GenBank permitió identificar cada uno de los aislados, siendo *D. seriata*, *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* y *Cylindrocarpon* spp. las especies aisladas con mayor frecuencia. Además de las especies asociadas a los decaimientos de la vid a las que se hizo referencia en el capítulo I de esta memoria, se identificaron *Cryptovalsa ampelina* y *Cylindrocarpon olidum*. *C. ampelina* fue aislada de una planta de 21 años con síntomas de Yesca procedente de la Ribera de Duero; esta especie fue descrita recientemente como patógeno de vid en España (Luque y col., 2006). *C. olidum* hasta el momento, no había sido descrita como patógeno de la vid en España, por lo que a pesar de que tan sólo fue aislada en dos cepas, una adulta con síntomas de Eutipiosis procedente de los Arribes del Duero, y otra joven con síntomas de Pie Negro procedente de Castilla La Mancha se

incluyó en los estudios de filogenia. La Figura 5 representa el dendrograma resultante del alineamiento de las secuencias correspondientes al ADN ribosómico amplificado con los cebadores ITS5 e ITS4.

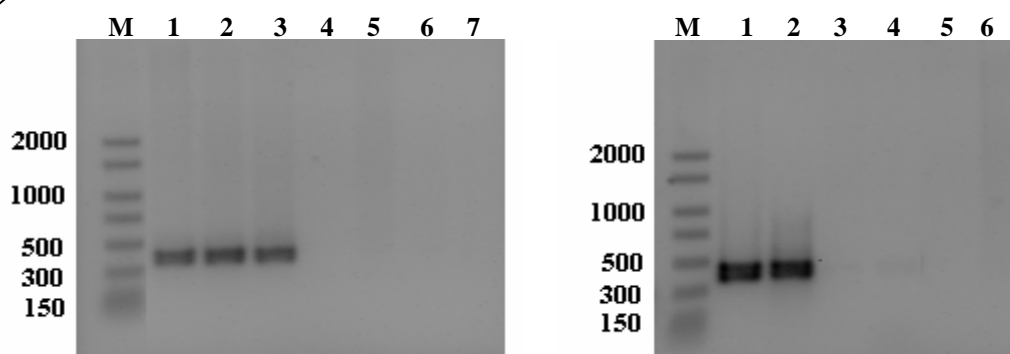


**Figura 5. Dendrograma resultante del alineamiento de la región ITS de especies asociadas a los decaimientos de la vid.** (MEGA 4, método Neighbor-joining, modelo Kimura2, bootstrap 1000 repeticiones).

## 2. Identificación de *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum*.

*P. chlamydospora* y *P. aleophilum*, asociadas a la enfermedad de Petri y a la Yesca, son dos especies de crecimiento muy lento, por lo que su identificación por métodos clásicos puede tardar meses. Los cebadores descritos por Tegli y col. (2000) permiten realizar un diagnóstico más rápido y específico mediante PCR.

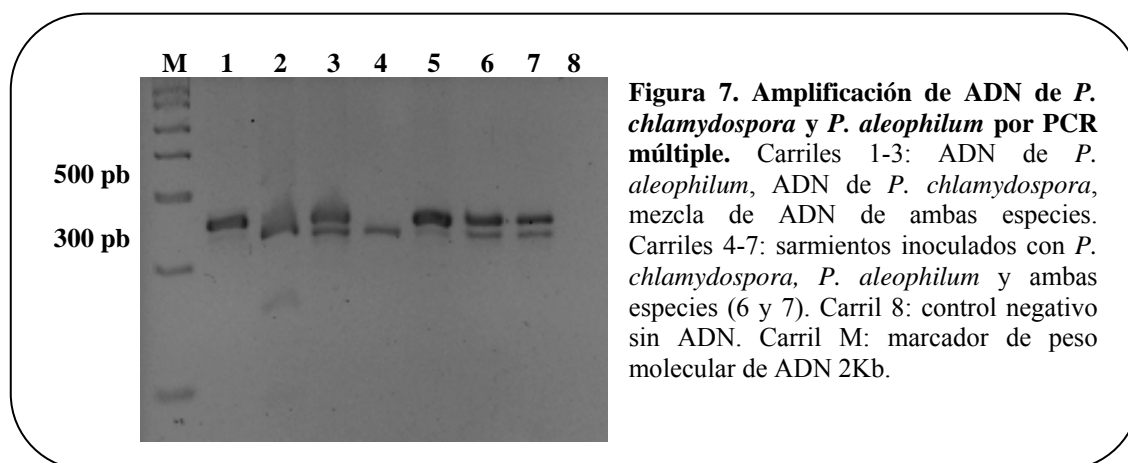
De esta forma se identificaron los aislados de *P. chlamydospora* por amplificación de un fragmento de 380 pb mediante los cebadores específicos Pch1 y Pch2 (Figura 6, izquierda) y una banda de 395 pb en los aislados de *P. aleophilum* con los cebadores específicos Pal1N y Pal2 (Figura 6, derecha).



**Figura 6. Productos de PCR obtenidos con los iniciadores Pch1 y Pch2 (izquierda) para la detección de *P. chlamydospora* y con los cebadores Pal1N y Pal2 (derecha) para la detección de *P. aleophilum* separados por electroforesis en gel de agarosa (1%).** Izquierda: *P. chlamydospora* CBS 239.74 (carril 1), V13-1 (carril 2), LR9 (carril 3), *C. destructans* CBS 119.41 (carril 4), *P. aleophilum* CBS 631.94 (carril 5), *D. seriata* CBS 719.85 (carril 6) y control negativo sin ADN (carril 7). Derecha: *P. aleophilum* CBS 631.94 (carril 1), Y174-1-1 (carril 2), *C. destructans* CBS 119.41 (carril 3), *P. chlamydospora* CBS 239.74 (carril 4), *D. seriata* CBS 719.85 (carril 5) y control negativo sin ADN (carril 6). Carriles M: marcador de peso molecular de ADN 2Kb.

De las 256 plantas analizadas en el laboratorio en 52 de ellas se aisló *P. chlamydospora*, y todos los aislados obtenidos dieron positiva la reacción de amplificación con los cebadores Pch1 y Pch2. De la misma manera en todos los aislados obtenidos de las 55 plantas infectadas con *P. aleophilum*, se obtuvo amplificación a partir de los cebadores Pal1N y Pal2. En ambos casos se amplificó específicamente una banda del tamaño indicado mientras que no se obtuvo ningún tipo de amplificación en el resto de especies aisladas.

Para disminuir el tiempo necesario para la identificación, y detectar de manera precoz ambas especies a partir de material vegetal, se puso a punto un sistema de PCR múltiple que permitió detectar ambas especies en una única reacción tanto a partir de ADN de cada una de las especies purificado, como a partir de material vegetal previamente inoculado (Figura 7).



### 3. Identificación de aislados pertenecientes al género *Cylindrocarpon*.

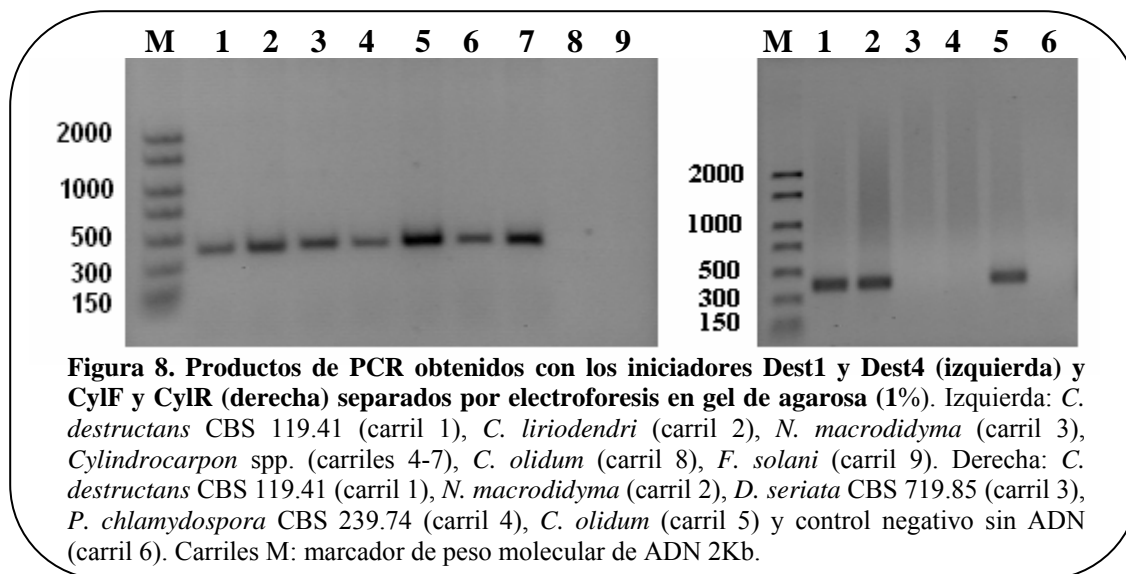
Como ya se comentó en el Capítulo I el porcentaje de aislamiento de *Cylindrocarpon* spp. a partir de las 256 muestras analizadas en este trabajo, fue del 13% (apartado 2, Resultados, Capítulo I). Hasta el momento tan sólo se habían descrito dos especies del género *Cylindrocarpon* asociados a los decaimientos de la vid, principalmente a la enfermedad de Pie negro: *Cylindrocarpon macrodidymum* (*Neonectria macrodydima*) y *Cylindrocarpon liriodendri* (*N. liriodendri*).

La secuenciación de ADN<sub>r</sub> amplificado con los cebadores ITS4 y 5 permitió identificar la especie a la que pertenecía cada uno de los aislados, obteniéndose que la especie mayoritariamente aislada fue *N. macrodidyma* (56,5% de los aislados), el 34,8 % resultaron ser *C. liriodendri*; y el 8,7% *Cylindrocarpon olidum*, especie no aislada hasta el momento de cepas con síntomas de decaimiento en España.

Los cebadores Dest1 y Dest4 descritos para la amplificación específica de ADN de *C. destructans* amplificaron todos los aislados que habían sido identificados como *Cylindrocarpon* spp. en base a las características morfológicas del cultivo, obteniéndose en todos ellos un fragmento de 400 pb (Figura 8, izquierda). Estos cebadores no sólo amplificaron ADN perteneciente a *C. destructans* sino que también amplifican los aislados de *C. macrodidymum* y *C. liriodendri*, por lo que no pueden considerarse iniciadores

específicos de *C. destructans*. Los aislados de *C. olidum* no fueron amplificados con estos cebadores por lo que tampoco pueden ser considerados específicos de género.

A partir de los cebadores CylF y CylR se amplificó una banda de 395 pb en todos los aislados identificados como *Cylindrocarpon* spp. (Figura 8, derecha) incluidos los aislados de *C. olidum*. Esta reacción no resultó ser tan específica debido a que también se obtuvo amplificación en algunos aislados de *Fusarium* spp., género filogenéticamente cercano a *Cylindrocarpon* spp.



Para abordar el estudio de las diferencias existentes entre las secuencias ITS de *N. macrodidyma*, *C. liriodendri*, *C. olidum* y *F. solani*, se realizó un alineamiento de los fragmentos amplificados con los cebadores ITS4 e ITS5, secuencia en la que anillan Dest1/Dest4 y CylF/CylR (Figura 9). Las secuencias de *N. macrodidyma* poseen una homología del 91% con las correspondientes a los aislados de *C. liriodendri*, siendo idénticas en las regiones de anillamiento de los cebadores (salvo una base en Dest1) por lo que tanto Dest1/Dest4 como CylF/CylR amplifican ambas especies. *C. olidum* posee 12 bases complementarias de las 17 bases de los cebadores Dest1/Dest4, razón por la que sus aislados no son amplificados con estos cebadores; por el contrario poseen la secuencia complementaria al cebador CylF y 15 bases de las 20 que anillan con el cebador CylR, permitiendo la amplificación de sus aislados con estos cebadores. *F. solani* posee 11 de las 17 bases complementarias al cebador Dest1 y 13 de las 17 bases complementarias a Dest4, razón por la que estos cebadores no amplifican los aislados de *F. solani*; en cambio sí son amplificados algunos de estos aislados con los cebadores CylF y CylR ya que posee 17/20 y 16/20 bases complementarias a cada uno de ellos respectivamente.



```

Y98-3-2a      GGAGGGATCATTAC-GAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 57
Y160-23-2c    GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 58
AY677290.1    -----CCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 45
Y205-19-5a    GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 58
Y238-3-1a     GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 58
Y216-2-3      GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 59
AY677270.1    -----CCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 46
Y117-11-1a    GGAGGGATCATT-CCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 58
Y56-8-3a      GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 59
Y160-54-1a    GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 59
AM412633.1    GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 59
Y112-34-1b    GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 59
AY677293.1    -----CCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 43
Y160-47-1a    -GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 55
Y112-34-1c    GGAGGGATCATTACCGAGTT-TACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTAT-TTGTTG 56

      * * * * *
Y98-3-2a      GGTCTGGCGGGT-----CCTGTTCCGACAG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 102
Y160-23-2c    CCTCTGGCGGGT-----CCTGTTCCGACAG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 103
AY677290.1    CCTCTGGCGGGT-----CCTGTTCCGACAG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 90
Y205-19-5a    CCTCTGGCGGGT-----CCTGTTCCGACAG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 103
Y238-3-1a     CCTCTGGCGGGT-----CCTGTTCCGACAG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 103
Y216-2-3      CCTCTGGCGGGT-----CCCGCTTCGGCGG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 104
AY677270.1    CCTCTGGCGGGT-----CCCGCTTCGGCGG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 91
Y117-11-1a    CCTCTGGCGGGT-----CCCGCTTCGGCGG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 103
Y56-8-3a      CCTCTGGCGGGT-----CCCGCTTCGGCGG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 104
Y160-54-1a    CCTCTGGCGGGT-----CCCGCTTCGGCGG-----CCCGCCAGAGGACCCCAAACC 104
AM412633.1    CTTCTGGCGGGTACAGACGGCCCTGTAAACACGGGCGGCCCCCGCCAGAGGACCCCTAACT 119
Y112-34-1b    CTTCTGGCGGGTACAGACGGCCCTGTAAACACGGGCGGCCCCCGCCAGAGGACCCCTAACT 119
AY677293.1    CTTCTGGCGGGTACCCCAACCCCTCGGGCGGAGGG---GCCGCCAGAGGACCCCAAACC 100
Y160-47-1a    CTTCTGGCGGGTACCCCAACCCCTCGGGCGGAGGG---GCCGCCAGAGGACCCCAAACC 112
Y112-34-1c    CTTCTGGCGGGTACCCCAACCCCTCGGGCGGAGGG---GCCGCCAGAGGACCCCAAACC 113

      * * * * *
Y98-3-2a      C---TGATTACATTTAAGAA---GTCTTCTGAGTAAACCGATTAAATAAATCAAAACTT 155
Y160-23-2c    C---TGATTACATTTAAGAA---GTCTTCTGAGTAAACCGATTAAATAAATCAAAACTT 156
AY677290.1    C---TGATTACATTTAAGAA---GTCTTCTGAGTAAACCGATTAAATAAATCAAAACTT 143
Y205-19-5a    C---TGATTACATTTAAGAA---GTCTTCTGAGTAAACCGATTAAATAAATCAAAACTT 156
Y238-3-1a     C---TGATTACATTTAAGAA---GTCTTCTGAGTAAACCGATTAAATAAATCAAAACTT 156
Y216-2-3      T---TGATTTTATAACAGT---ATCTTCTGAGTAAAT-GATTAAATCAATCAAAACTT 156
AY677270.1    T---TGATTTTATAACAGT---ATCTTCTGAGTAAAT-GATTAAATCAATCAAAACTT 143
Y117-11-1a    T---TGATTTTATAACAGT---ATCTTCTGAGTAAAT-GATTAAATCAATCAAAACTT 155
Y56-8-3a      T---TGATTTTATAACAGT---ATCTTCTGAGTAAAT-GATTAAATCAATCAAAACTT 156
Y160-54-1a    T---TGATTTTATAACAGT---ATCTTCTGAGTAAAT-GATTAAATCAATCAAAACTT 156
AM412633.1    C---TGTTTTTAT---AATG---TTTTTCTGAGTAAAC-AAGCAAATAAATTAATAACTT 168
Y112-34-1b    C---TGTTTTTAT---AATG---TTTTTCTGAGTAAAC-AAGCAAATAAATTAATAACTT 168
AY677293.1    CAACTGTTTTTTCCGTAACGAAACCTATTCTGAGTGAATTATTAAATAAATCAAAACTT 160
Y160-47-1a    CAACTGTTTTTTCCGTAACGAAACCTATTCTGAGTGAATTATTAAATAAATCAAAACTT 172
Y112-34-1c    CAACTGTTTTTTCCGTAACGAAACCTATTCTGAGTGAATTATTAAATAAATCAAAACTT 173

      * * * * *
Y98-3-2a      TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 215
Y160-23-2c    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 216
AY677290.1    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 203
Y205-19-5a    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 216
Y238-3-1a     TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 216
Y216-2-3      TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 216
AY677270.1    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 203
Y117-11-1a    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 215
Y56-8-3a      TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 216
Y160-54-1a    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 216
AM412633.1    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 228
Y112-34-1b    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 228
AY677293.1    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 220
Y160-47-1a    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 232
Y112-34-1c    TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 233

      * * * * *
Y98-3-2a      TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 275
Y160-23-2c    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 276
AY677290.1    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 263
Y205-19-5a    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 276
Y238-3-1a     TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 276
Y216-2-3      TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 276
AY677270.1    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 263
Y117-11-1a    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 275
Y56-8-3a      TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 276
Y160-54-1a    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 276
AM412633.1    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 288
Y112-34-1b    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 288
AY677293.1    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 280
Y160-47-1a    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 292
Y112-34-1c    TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTA 293

      * * * * *

```

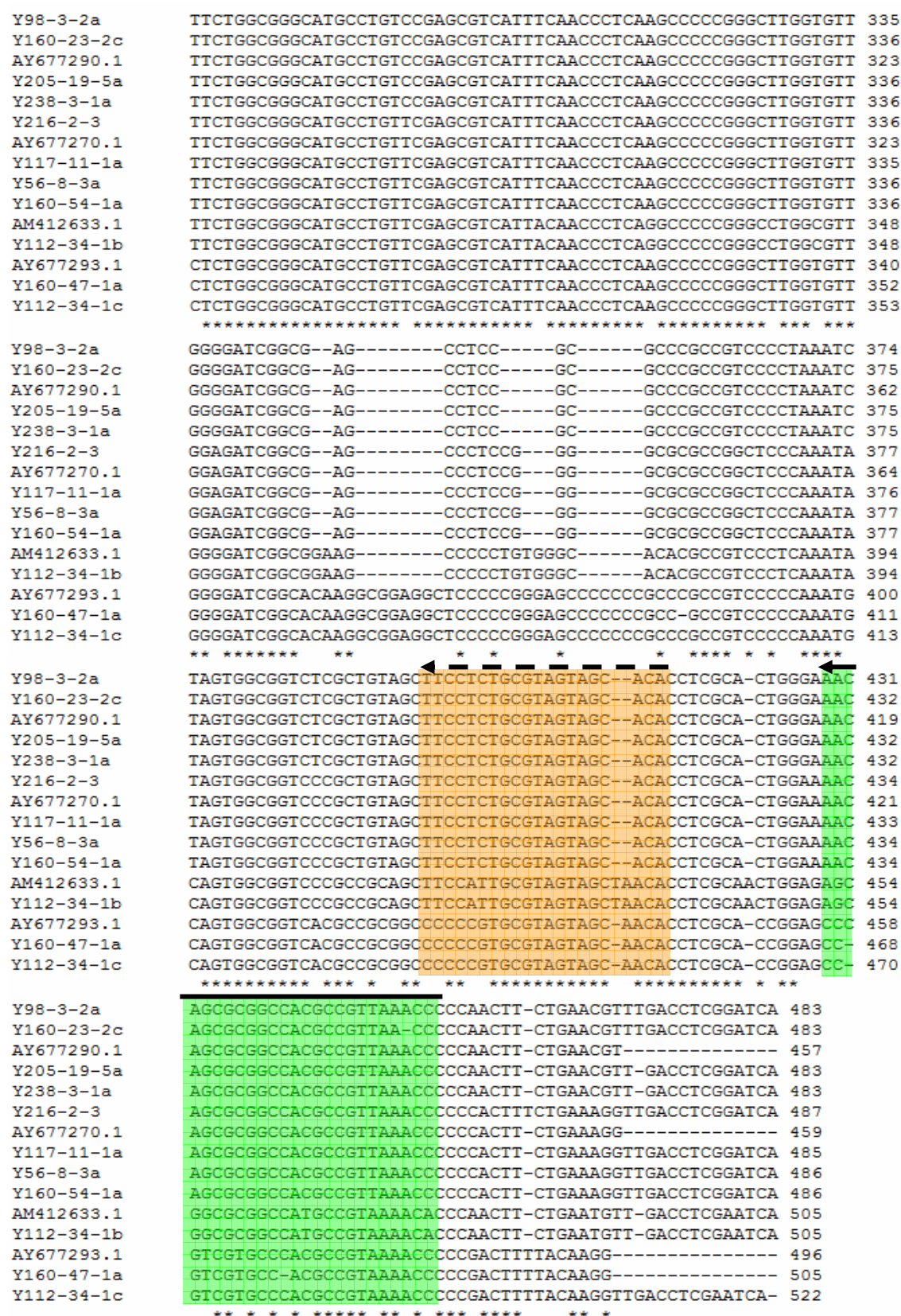
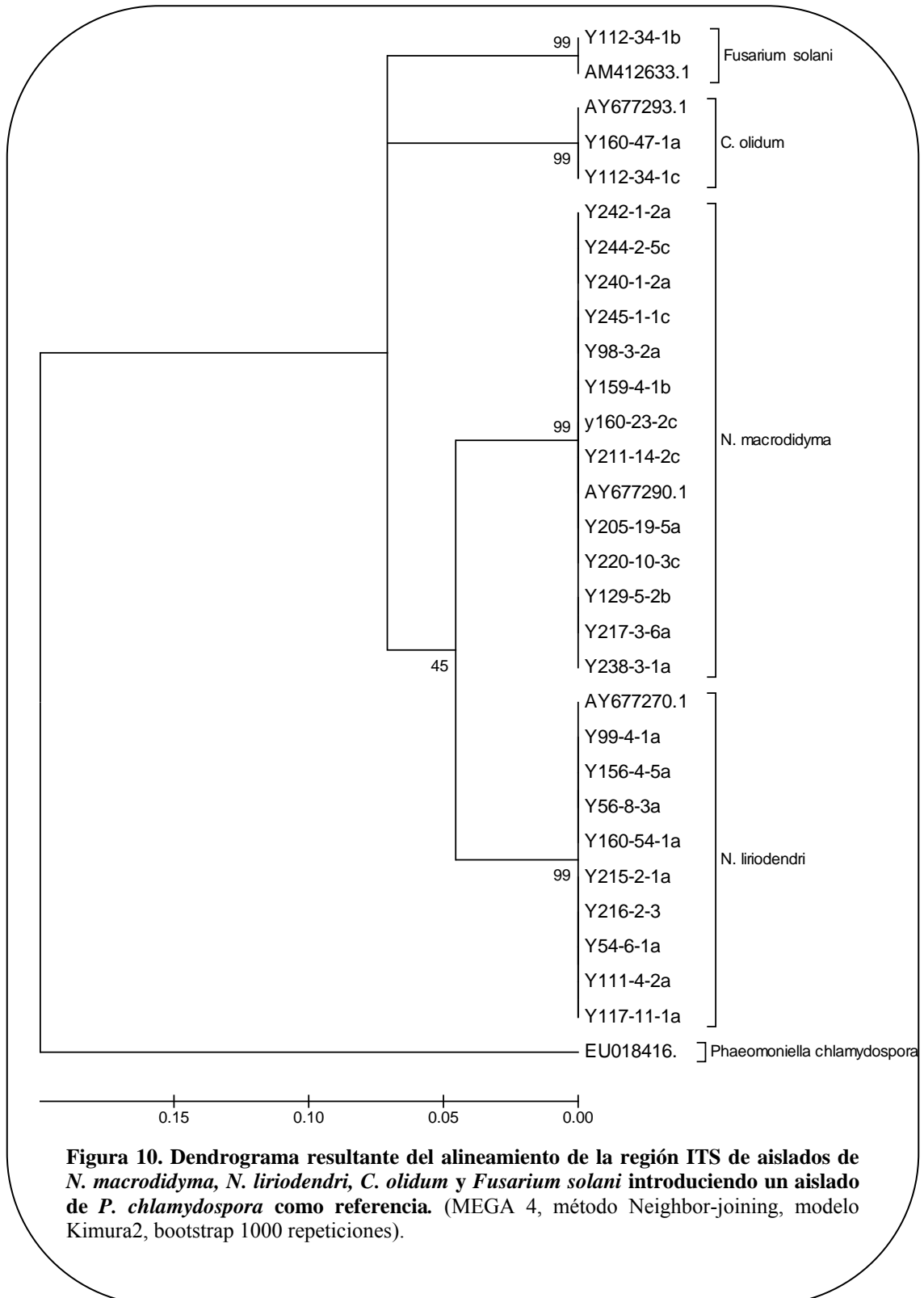


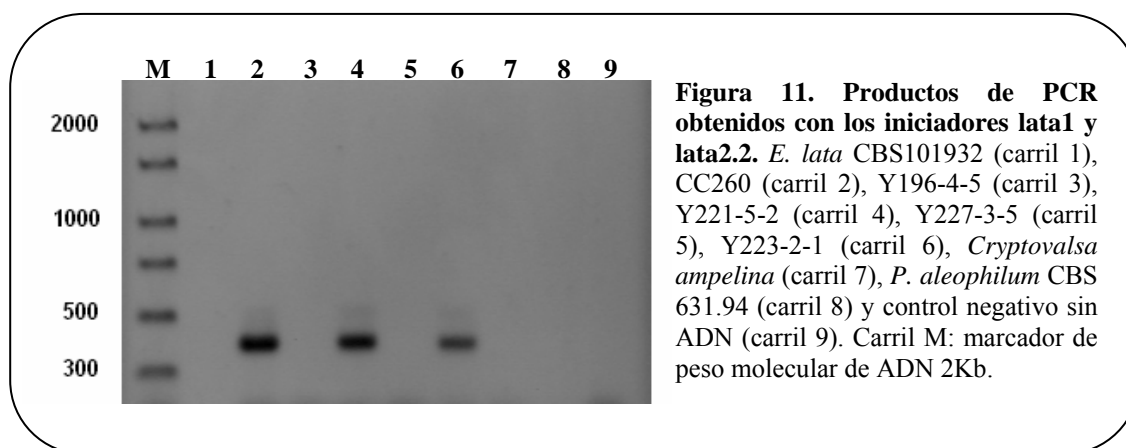
Figura 9. Alineamiento de las secuencias amplificadas con los cebadores ITS4 e ITS5 de *N. macrodidyma* (Y98-3-2a, Y160-23-2c, Y205-19-5a, Y238-3-1a y AY677290.1), *N. liriodendri* (Y56-8-3a, Y117-11-1a, Y160-54-1a, Y216-2-3 y AY677270.1), *C. olidum* (Y112-34-1c, Y160-47-1a y AY677293.1) y *Fusarium solani* (Y112-34-1b y AM412633.1). Las flechas indican las posiciones de los cebadores Dest1/Dest4 (trazo continuo) y CylF/CylR (trazo discontinuo).

A partir del alineamiento anterior se generó un dendrograma que evidenció la similitud existente entre las secuencias de *N. macrodidyma* y *C. liriodendri*, frente a las secuencias de *C. olidum* y *F. solani* (Figura 10). En la elaboración del dendrograma se añadió una secuencia de *P. chlamydospora* obtenida del NCBI (EU018416).



#### 4. Identificación de aislados de *Eutypa lata*

A pesar de que se considera a *Eutypa lata* la principal especie causante de la Eutipiosis, de las 256 plantas analizadas tan sólo se aisló en 9 plantas, todas ellas adultas, de las cuales 5 presentaban síntomas de Eutipiosis y 4 presentaban síntomas de Yesca. La identificación por PCR a partir de los cebadores lata1 y lata2.2 no siempre fue posible ya que no hubo amplificación en todos los aislados ensayados. En los casos en los que la identificación por PCR fue positiva se amplificó un fragmento de 385 pb (Figura 11).



La zona de alineamiento de los cebadores lata1 y lata2.2 se localiza en la región ITS por lo que se realizó un análisis de las secuencias amplificadas con los cebadores ITS4 e ITS5 de los distintos aislados, para comprobar si existía alguna diferencia que explicara la no amplificación de parte de los aislados con los cebadores específicos. El alineamiento mostró que las zonas de anillamiento de los cebadores tan sólo se distinguen en una base en la secuencia complementaria al cebador lata1. Los aislados que no fueron amplificados con los cebadores presentaban una mutación puntual, una T en lugar de una C, en la posición 16 del cebador..

#### 5. Identificación de especies de Botryosphaeriaceae por patrones de restricción.

Como ya se indicó en el capítulo I de esta memoria los miembros de la familia Botryosphaeriaceae aparecieron en el 43% de las cepas analizadas, constituyendo uno de los grupos de hongos mayoritarios. La amplificación de la región ITS y la posterior comparación de las secuencias obtenidas (Figura 12), evidenció la gran similitud existente entre algunas de las especies a estudio. El alineamiento reveló la existencia de tres grupos de homología entre las seis especies estudiadas: grupo I formado por *Do. iberica* y *Do. sarmentorum* que presentó una homología del 100%, grupo II formado



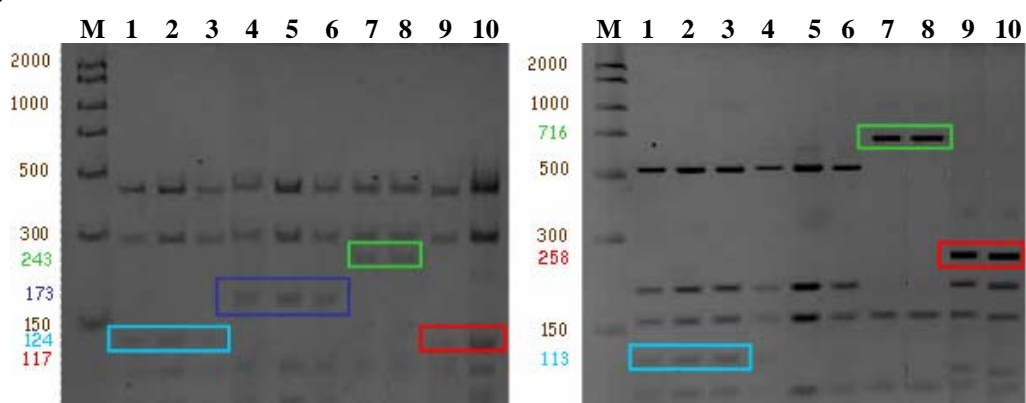
por *D. seriata* y *D. mutila* con una homología del 99% y el grupo III formado por *B. dothidea* y *N. parvum* que a pesar de pertenecer a géneros diferentes presentaron una homología del 97%, en esa región del genoma.

B.dothidea	CTCCGGCTCGACTCTCCACCCCTATGTGTACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCC-GCGG	59
N.parvum	CTCCGGCTCGACTCTCCACCCCAATGTGTACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCC-GCGG	59
Do.iberica	CTCCGGCTCGACTCTCCACCCCTTTGTGTACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCCGCGG	60
Do.sarmentorum	CTCCGGCTCGACTCTCCACCCCTTTGTGTACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCCGCGG	60
D.mutila	CTTCGGCTCGAATCTCCACCCCTTTGTGAACATACCTCTGTTGCTTTGGCGG-CTCTTTG	59
D.seriata	CTTCGGCTCGAATCTCCACCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCTCTTTG	60
	** ***** *	
B.dothidea	TCCTCCGCACCGGCCCCCTTCGGGGGGCTGGCCAGCGCCGCCAGAGGACCACAAAAC	119
N.parvum	TCCTCCGCACCGGCGCCC-TTCGAGGGGGCTGGCCAGCGCCGCCAGAGGACCATAAAAC	118
Do.iberica	TC-----GGCCTC-----GTGCCGTCCAGCACCCGCCAGAGGACCACAAAAC	103
Do.sarmentorum	TC-----GGCCTC-----GTGCCGTCCAGCACCCGCCAGAGGACCACAAAAC	103
D.mutila	CC--GCGAGGAGGCCCTCGCGGGCCCCCGCGCGCTTTCCGCCAGAGGACCTTCAAACT	117
D.seriata	CC--GCGAGGAGGCCCTCGCGGGCCCCCGCGCGCTTTCCGCCAGAGGACCTTCAAACT	118
	* *** * * *	
B.dothidea	CCAGTCAGCAAAACGTGCGAGTCTGAAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGG	179
N.parvum	CCAGTCAGTGAACCTTCGAGTCTGAAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGG	178
Do.iberica	CCAGTCAGTAAACGTCTCAGTCTGAAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGG	163
Do.sarmentorum	CCAGTCAGTAAACGTCTCAGTCTGAAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGG	163
D.mutila	CCAGTCAGTAAACGTGCGAGTCTGATAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGG	177
D.seriata	CCAGTCAGTAAACGTGCGAGTCTGATAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGG	178
	***** ** *	
B.dothidea	ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCCGATAAGTAATGTGAATTGC	239
N.parvum	ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCCGATAAGTAATGTGAATTGC	238
Do.iberica	ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCCGATAAGTAATGTGAATTGC	223
Do.sarmentorum	ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCCGATAAGTAATGTGAATTGC	223
D.mutila	ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCCGATAAGTAATGTGAATTGC	237
D.seriata	ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCCGATAAGTAATGTGAATTGC	238
	*****	
B.dothidea	AGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGGGG	299
N.parvum	AGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGGGG	298
Do.iberica	AGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGGGG	283
Do.sarmentorum	AGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGGGG	283
D.mutila	AGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGCATTCCGAGGGG	297
D.seriata	AGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGCATTCCGAGGGG	298
	***** ** *	
B.dothidea	CATGCCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCCGTCCTC	359
N.parvum	CATGCCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCCCCGTCCTC	358
Do.iberica	CATGCCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCCGTCCTC	343
Do.sarmentorum	CATGCCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCCGTCCTC	343
D.mutila	CATGCCCTGTTCCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCCGTCCTC	357
D.seriata	CATGCCCTGTTCCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCCGTCCTC	358
	*****	
B.dothidea	C--ACGACGCGCCTCGAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTG--CCTCAGCGTAGTAGAAA	415
N.parvum	C--ACGACGCGCCTTAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTG--CCTCAGCGTAGTAGAAA	414
Do.iberica	---AGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTG--CCTCAGCGTAGTAGAAA	398
Do.sarmentorum	---AGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTG--CCTCAGCGTAGTAGAAA	398
D.mutila	TCTGCGGACGCGCCTTAAAGACCTCGGCGGTGGCGTGTTCAGCCCTCAAGCGTAGTAGAAT	417
D.seriata	TCTGCGGACGCGCCTTAAAGACCTCGGCGGTGGCGTGTTCAGCCCTCAAGCGTAGTAGAAT	418
	***** *	
B.dothidea	ACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGTCGCCCGCCGGACGAACC	458
N.parvum	ACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGTCGCCCGCCGGACGAACC	457
Do.iberica	ACACCTCGCTTTGGAGTGCATGGCGTCGCCCGCCGGACGAACC	441
Do.sarmentorum	ACACCTCGCTTTGGAGTGCATGGCGTCGCCCGCCGGACGAACC	441
D.mutila	ACACCTCGCTTTGGAGCGGTGGCGTCGCCCGCCGGACGAACC	460
D.seriata	ACACCTCGCTTTGGAGCGGTGGCGTCGCCCGCCGGACGAACC	461
	***** *	

Figura 12. Alineamiento de secuencias correspondientes a la región ITS amplificada con los cebadores ITS4 e ITS5 de las principales especies de la familia Botryosphaeriaceae asociadas a los decaimientos de la vid.

La identificación de las distintas especies de esta familia se realizó en base a los patrones de restricción del amplímero ITS1/NL4 (1200 pb) obtenidos con las endonucleasas *TaqI*, *BsuRI*, *Sau96* y *AluI*:

*TaqI* permitió distinguir *D. seriata*, *D. mutila*, *B. dothidea* y *N. parvum*, especies que mostraron bandas específicas de 124 pb, 173 pb, 243 pb y 117 pb respectivamente (Figura 13, izquierda). Con *BsuRI* se identificaron *D. seriata*, *B. dothidea* y *N. parvum*, por la presencia de bandas específicas de 113 pb, 716 pb y 268 pb respectivamente (Figura 13, derecha). Con *AluI* se obtuvo una banda de 316 pb en los aislados de *Do. iberica* y *Do. sarmentorum* que permitió diferenciarlos del resto de las especies de Botryosphaeriaceae, sin embargo no se obtuvo ninguna banda que permitiera diferenciar ambas especies por lo que hubo que recurrir a la secuenciación para su identificación. Con la endonucleasa *Sau96* se obtuvieron dos bandas específicas de 254 y 240 pb en los aislados de *N. parvum*; una banda de 1.002 pb en *B. dothidea*, en *D. seriata* se obtuvo una banda específica de 63 pb y en *D. mutila* de 112 pb.



**Figura 13. Identificación de especies de Botryosphaeriaceae por restricción con endonucleasas.** Restricción con *TaqI* (izquierda) y *BsuRI* (derecha) de *D. seriata* (carriles 1-3: *D. seriata* CBS 719.85, Y121-14-1, Y84-1-1), *D. mutila* (carriles 4-6: *D. mutila* CBS 43182, Y63-1-1, Y126-79L-1), *B. dothidea* (carriles 7 y 8: *B. dothidea* CBS 113190, Y127-8-1) y *N. parvum* (carriles 9 y 10: *N. parvum* CBS 110301, Y91-3-1). Los recuadros señalan las bandas características de cada una de las especies. Carril M marcador de peso molecular de 2Kb.

Como ya se indicó en el Capítulo I, la identificación de las especies de Botryosphaeriaceae mediante enzimas de restricción permitió establecer el grado de implicación de cada una de las especies en las muestras analizadas (Figura 14). En aquellos casos en los que el análisis de los patrones de restricción no permitieron una identificación definitiva, como en el caso de algunos aislados de *Do. sarmentorum*, *Do. iberica* o *Do. viticola*, se recurrió a la identificación por secuenciación del amplímero

ITS4/5. Teniendo en cuenta los datos obtenidos a partir de las 256 muestras analizadas, la especie mayoritaria resultó ser *D. seriata* aislada en el 59 % de las muestras que poseían alguna especie de la familia Botryosphaeriaceae, seguida de *D. mutila* (23 %), *N. parvum* (14%), *B. dothidea* (8 %), *Do. sarmentorum* (2%), *Do. iberica* (1 %) y *Do. viticola* (1 %).

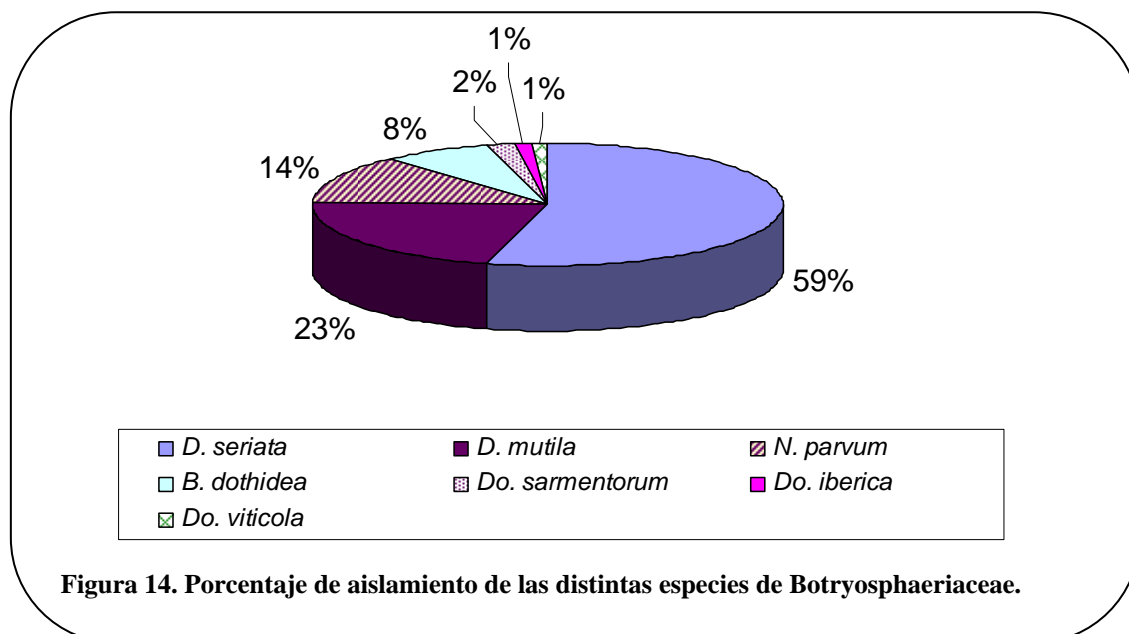


Figura 14. Porcentaje de aislamiento de las distintas especies de Botryosphaeriaceae.

En la Figura 15 se reflejan los datos obtenidos de muestras procedentes de Castilla y León. Podemos observar que unas especies se aíslan mayoritariamente en cepas jóvenes, como es el caso de *N. parvum* (54% en cepas jóvenes, 2 % en cepas adultas), mientras que otras se aíslan exclusivamente en cepas adultas, como *D. mutila* y *Do. sarmentorum*, o en cepas jóvenes como *Do. iberica*.

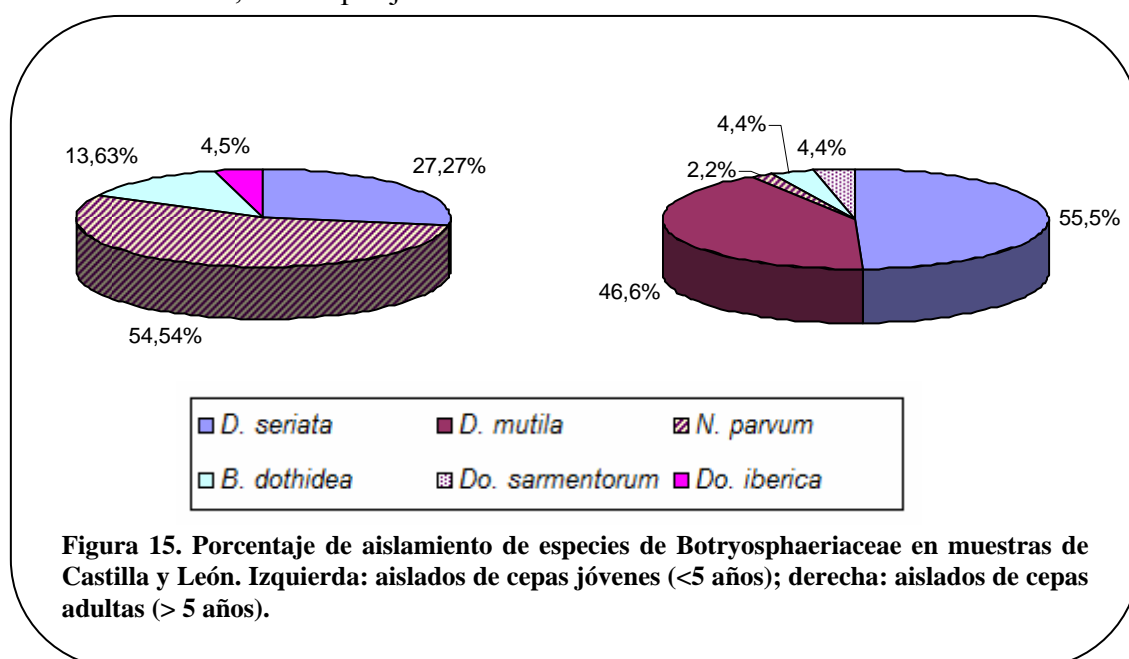
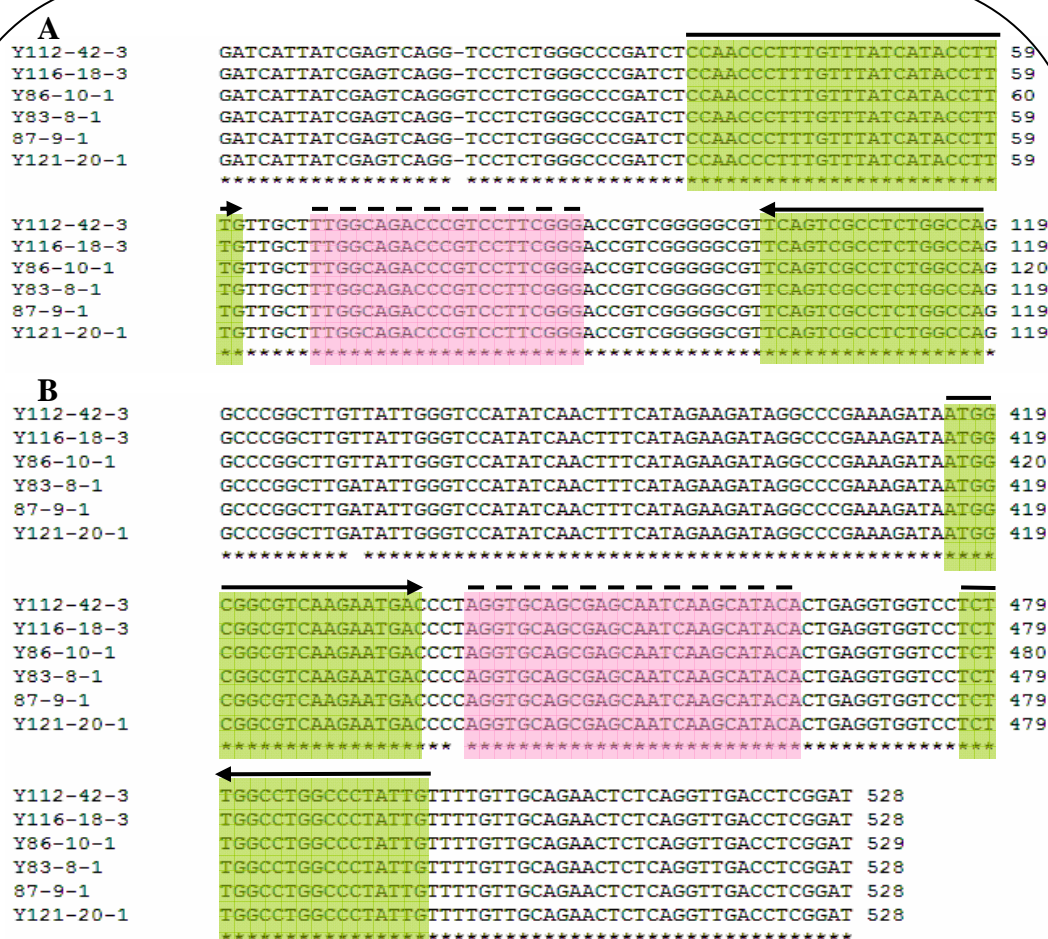


Figura 15. Porcentaje de aislamiento de especies de Botryosphaeriaceae en muestras de Castilla y León. Izquierda: aislados de cepas jóvenes (<5 años); derecha: aislados de cepas adultas (> 5 años).

## 6. Detección de *P. chlamydospora* mediante PCR a tiempo real.

### 6.1. Diseño del sistema

El alineamiento de las secuencias del amplicón ITS4-5 obtenidas de 42 aislados de *P. chlamydospora* permitió establecer una secuencia consenso del conjunto de los aislados analizados, que fue utilizada para el posterior diseño de los cebadores y las sondas TaqMan®. El alineamiento completo de los 528 pb secuenciados se representa en la Figura 8 del capítulo III de esta memoria. De los posibles sistemas propuestos por el programa Primer Express, se seleccionaron dos parejas de cebadores complementarios a dos regiones del amplicón ITS4-5, la primera pareja complementaria a un fragmento de la región ITS1 situada entre los nucleótidos 36 a 118 y la segunda pareja complementaria a un fragmento de la región ITS2 situada entre los nucleótidos 417 a 495. En ambos casos el tamaño del fragmento amplificado fue de aproximadamente 80 pb (Figura 16).



**Figura 16. Cebadores y sondas diseñadas utilizadas para el diseño del sistema RTi-PCR. A: Alineamiento con cebadores y sonda diseñados en la región ITS 1 (cebadores *pchITS36F/118R* y sonda *pchITS67P*). B: Alineamiento con cebadores y sonda diseñados en la región ITS 2 (cebadores *pchITS417F/495R* y sonda *pchITS439P*). Las líneas de trazo continuo representan las secuencias de los cebadores y las de trazo discontinuo representan las secuencias de las sondas.**



## 6.2. Especificidad del sistema

Con la secuencia consenso se realizó un análisis *in silico* en el GenBank en busca de similitudes con regiones de otros hongos utilizando el programa BLASTN para comprobar que existía suficiente divergencia que permitiera producir una amplificación específica. La comparación de la secuencia amplificada con los cebadores *PchITS36F* y *PchITS118R* dio como resultado una homología del 100% con *P. chlamydospora* y con *Fragosphaeria reniformes* (número de acceso AB278193.1); mientras que la comparación del fragmento amplificado con *PchITS417F* y *PchITS495R* sólo mostró una homología del 100% con aislados de *P. chlamydospora*.

Se estudió la especificidad experimentalmente de cada uno de los dos sistemas mediante el análisis de 5 ng de ADN genómico en 60 aislados de *P. chlamydospora* (Tabla 3) así como en otras 16 especies relacionadas con las enfermedades de madera (Tabla 4). Los resultados demostraron que el sistema 36F/118R era inespecífico ya que se observaron amplificaciones en *C. macrodidymum*, *D. seriata*, *D. mutila*, *B. dothidea* y *Do. sarmentorum*. Sin embargo, el sistema 417F/495R demostró ser específico, amplificando únicamente ADN de *P. chlamydospora* (Tablas 3 y 4). La amplificación del fragmento ITS4/5 fue positiva en todos los aislados analizados, lo que permitió descartar la existencia de falsos negativos debido a problemas con los ADNs utilizados.

Especies	Aislado	Procedencia	Resultados PCR		
			ITS5/ITS4	36F/118R	417F/495R
<i>P. chlamydospora</i>	CBS <sup>a</sup> 161.90	Sudáfrica	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	CBS <sup>a</sup> 239.74	California, EE.UU.	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	LR9	Assignan, Francia	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	LR47	St Christol, Francia	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	INIA56	Madrid	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	V13-1	vivero	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	VR3-2	vivero	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	VR6-1	vivero	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	VR7-1	vivero	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	VR39-1	vivero	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y38-8-1	Zamora	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y41-2-2	Extremadura	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y80-6-1	Zamora	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y80-10-2	Zamora	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y82-11-4	Zamora	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y82-15-1	Zamora	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y83-9-1	Zamora	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y86-10-1	Zamora	+	+	+

Especies	Aislado	Procedencia	Resultados PCR		
			ITS5/ITS4	36F/118R	417F/495R
<i>P. chlamydospora</i>	Y87-5-3	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y87-7-1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y87-9-1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y89-4-2	Valladolid	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y89-7-1	Valladolid	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y105-3-2	Extremadura	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y106-3-3	Extremadura	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y106-4-3	Extremadura	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y112-42-3	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y116-18-3	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y116-35L4	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y119-8-5	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y121-20L1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y121-27L1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y121-29-6	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y122-3-6	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y122-14-3	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y123-16L-1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y124-13L-1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y125-36L-1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y126-11-1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y127-4-1	Galicia	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y160-36-2	Ciudad Real	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y161-10-2	Alicante	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y161-19-1	Alicante	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y162-20-1	Alicante	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y163-12-1	Alicante	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y163-16-1	Alicante	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y164-16-1	Alicante	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y168-9-2	Alicante	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y170-1-1	Alicante	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y185-15-1	Burgos	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y192-1-1	Zamora	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y201-9-5	Zamora	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	Y206-10-1	Zamora	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	136/153 C1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	136/153 D3	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	323/322 B2	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	410/350 C1	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	489/395 B3	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	489/395 C3	Salamanca	+	+	+
<i>P. chlamydospora</i>	489/395 D2	Salamanca	+	+	+

**Tabla 3. Aislados de *P. chlamydospora* utilizadas en la puesta a punto del sistema RTi-PCR.**

<sup>a</sup> CBS, Centraalbureau voor Schimmelfcultures.

Especies	Aislado	Procedencia	Resultados PCR		
			ITS5/ITS4	36F/118R	417F/495R
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	CBS <sup>a</sup> 631.94	Italia	+	-	-
<i>Phaeoacremonium viticola</i>	CBS <sup>a</sup> 113065	Sudáfrica	+	-	-
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	CBS <sup>a</sup> 119.41	Holanda	+	-	-
<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>	CBS <sup>a</sup> 120170	Eslovenia	+	+	-
<i>Diplodia seriata</i>	CBS <sup>a</sup> 112555	Portugal	+	+	-
<i>Diplodia mutila</i>	CBS <sup>a</sup> 431.82	Holanda	+	+	-
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CBS <sup>a</sup> 110302	Portugal	+	+	-
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	CBS <sup>a</sup> 120.41	Noruega	+	+	-
<i>Dothiorella iberica</i>	CBS <sup>a</sup> 115035	España	+	-	-
<i>Dothiorella viticola</i>	CBS <sup>a</sup> 117006	España	+	-	-
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CBS <sup>a</sup> 110301	Portugal	+	-	-
<i>Neofusicoccum luteum</i>	CBS <sup>a</sup> 110299	Portugal	+	-	-
<i>Stereum hirsutum</i>	CBS <sup>a</sup> 416.61	Austria	+	-	-
<i>Eutypa lata</i>	CBS <sup>a</sup> 101932	Holanda	+	-	-
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Y189-22-2	España	+	-	-
<i>Alternaria solani</i>	CBS <sup>a</sup> 109157	EE.UU	+	-	-

Tabla 4. Otras especies de hongos utilizadas en la puesta a punto del sistema RTi-PCR para la detección específica de *P. chlamydospora*. <sup>a</sup> CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

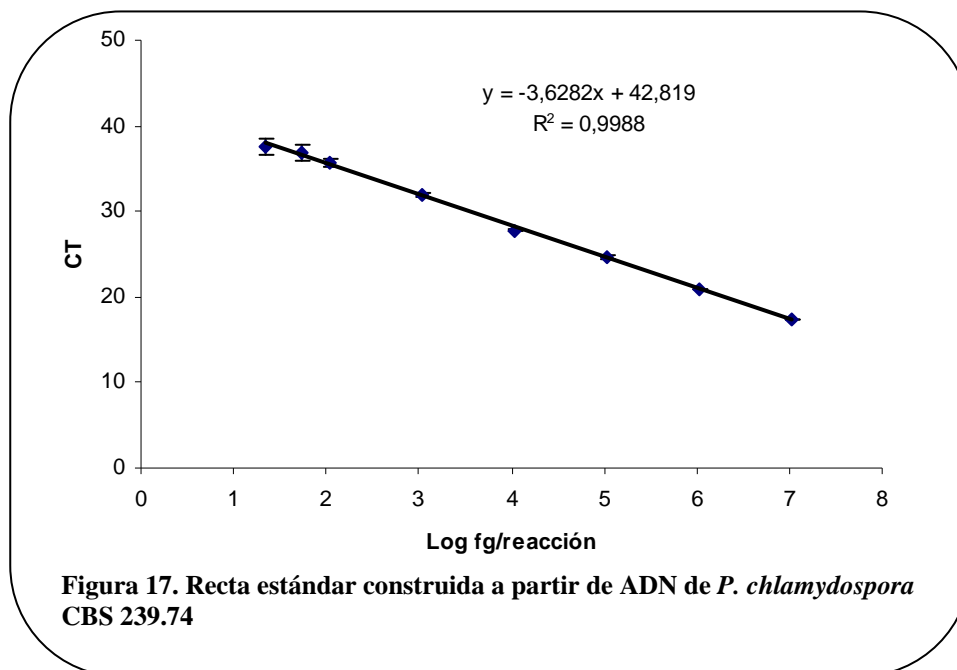
### 6.3. Sensibilidad del sistema PchITS417F/495R

La determinación de la sensibilidad se realizó mediante la interpolación en una curva patrón generada a partir de muestras de ADN de *P. chlamydospora* de concentración conocida. Se amplificaron nueve réplicas independientes en un rango de 108 ng a 108 fg y treinta replicados de los valores: 54; 21,6; 10,8 y 1,08 fg. En la Tabla 5 se muestran las medias de los valores de C<sub>T</sub> obtenidos en las reacciones. El sistema produjo amplificación positiva en todos los replicados desde 108 ng hasta 108 fg. Cuando se utilizaron 54 fg de ADN genómico la amplificación fue positiva en el 80% de los casos (24 replicados positivos de los 30 realizados). Cuando se utilizaron 1,08 fg de ADN genómico sólo 1 de los 30 replicados resultó positivo.

fg / reacción	C <sub>T</sub>	Positivos / total
108.000.000	15,51 ± 0,294	9/9
10.800.000	17,38 ± 0,054	9/9
1.080.000	20,90 ± 0,048	9/9
108.000	24,51 ± 0,090	9/9
10.800	27,81 ± 0,046	9/9
1.080	31,92 ± 0,274	9/9
108	35,73 ± 0,479	9/9
54	36,81 ± 0,89,	24/30
21,6	37,58 ± 0,990	18/30
10,8	37,42 ± 0,711	17/30
1,08	37,26	1/30

Tabla 5. Determinación del límite de detección del sistema de RTi-PCR a partir de DNA genómico de *P. chlamydospora* CBS 239.74.

Con los datos obtenidos se construyó una curva estándar con un  $R^2$  de 0,99 y una pendiente de -3,62 (Figura 17), mostrando una eficiencia adecuada, ya que el valor es cercano a -3,32 que indicaría una eficiencia del 100% en la PCR. Se estableció un LOD por debajo de 100 fg ya que éste valor puede ser detectado en un 95% de las muestras.

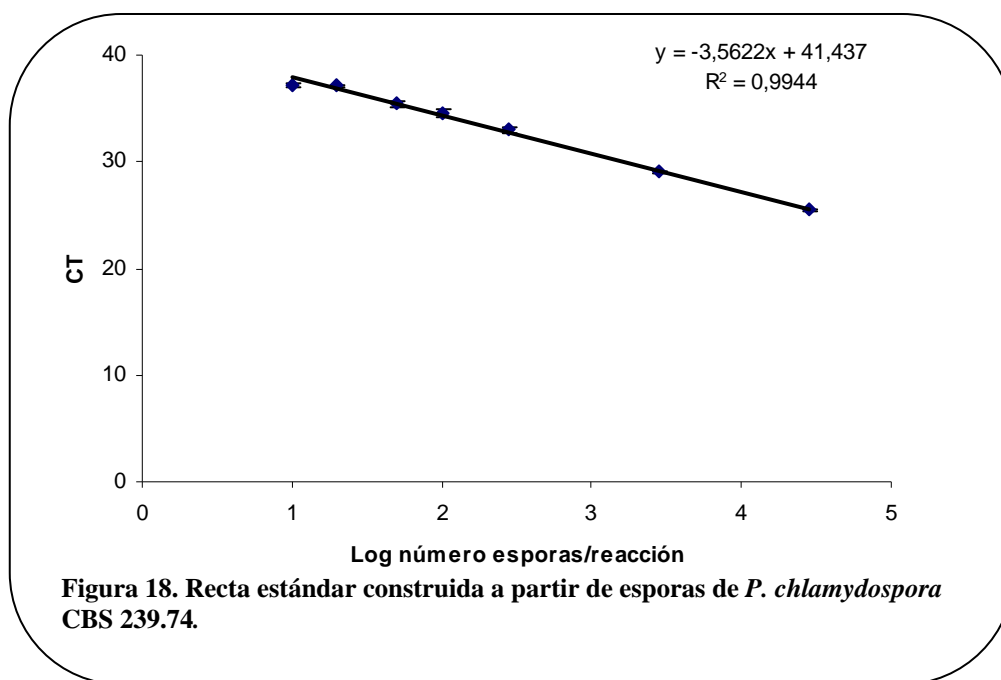


La determinación de la sensibilidad a partir de esporas de ADN se realizó mediante la interpolación en una curva patrón generada a partir de una solución de esporas de *P. chlamydospora* de concentración conocida. Se amplificaron nueve réplicas independientes en un rango de 27.890 a 50 esporas y treinta replicados de 20, 10, 5 y 1 espóra. En la Tabla 6 se muestran las medias de los valores de  $C_T$  obtenidos en las reacciones. El sistema produjo amplificación positiva en todos los replicados desde 27890 hasta 50 esporas. Cuando se utilizaron 20 esporas la amplificación fue positiva en el 90% de los casos. Cuando se utilizaron 5 esporas sólo 6 de los 30 replicados resultó positivo.

Nº esporas / reacción	$C_T$	Positivo / Total
27.890	25,48 ± 0,11	9/9
2.789	29,03 ± 0,07	9/9
279	32,98 ± 0,26	9/9
100	34,57 ± 0,38	9/9
50	35,41 ± 0,23	9/9
20	37,14 ± 0,07	27/30
10	37,26 ± 0,20	19/30
5	37,33 ± 0,30	6/30
1	39,58	1/30

Tabla 6. Determinación del límite de detección del sistema de RTi-PCR a partir de esporas de *P. chlamydospora* CBS 239.74.

Con los datos obtenidos se construyó una recta estándar con un  $R^2$  de 0,99 y una pendiente de -3,56 (Figura 18). Se estableció un LOD alrededor de 25 esporas ya que éstas pueden ser detectadas en un 95% de las muestras.



## Discusión

La identificación de hongos por métodos moleculares mediante PCR convencional, PCR múltiple o RTi-PCR, permite la identificación inequívoca de la especie a la que pertenecen cada uno de los aislados, mejorando y complementando la identificación basada en criterios morfológicos, que en la mayoría de los casos no permite distinguir entre las especies pertenecientes a un mismo género, al menos de manera fiable. Gracias a estas metodologías hemos podido identificar cada una de las especies de hongos aisladas a partir de las muestras de vid recogidas de distintas parcelas de Castilla y León o llegadas al laboratorio de hongos del Departamento de Viticultura del ITACYL. Las especies mayoritarias han resultado ser *D. seriata*, *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* y *Cylindrocarpon* spp. (principalmente *N. macrodidyma* y *C. liriodendri*), mientras que especies consideradas durante años como causantes de distintas enfermedades, como *E. lata*, *F. mediterranea*, *P. viticola* o *S. hirsutum*, son aisladas con poca frecuencia en los viñedos de Castilla y León. Los datos obtenidos deberían hacernos reflexionar a cerca de la naturaleza y sintomatología de cada una de las enfermedades citadas en nuestra región. Los síntomas en hoja característicos de enfermedades como Yesca y BDA son prácticamente indiferenciables en las variedades blancas, mientras que en las variedades tintas se diferencian por la presencia de una línea morada en el caso de BDA (Lecomte y col., 2005). Como ya se ha comentado anteriormente, la sintomatología de la Eutipiosis debida según sus descriptores a *E. lata*, se caracteriza a nivel de la madera, por necrosis en forma de cuña, muy similar a la producida por especies de la familia Botryosphaeriaceae, principalmente *D. seriata*, por lo que se hace necesario profundizar en los síntomas producidos por cada una de las especies.

*C. destructans* es el causante del Pie Negro en Portugal, así como en otras zonas vitivinícolas mundiales (Grasso, 1984; Halleen y col., 2004; Rego y col., 2000), mientras *C. obtusisporum* es la especie responsable de esta patología en Italia (Grasso y col., 1975). En California además de *C. destructans* se ha descrito *C. macrodidymum* (Petit y Gubler, 2005). En 2007 Petit y Gubler renombraron todos los aislados identificados como *C. destructans* en California como *C. liriodendri* en base a sus características moleculares. En la presente memoria se han aislado *C. macrodidymum*, *C. liriodendri* y una especie no descrita hasta el momento como patógeno de vid en

España: *C. olidum*, especie que se diferencia de las mencionadas anteriormente en base a su región ITS. A pesar de que *C. olidum* ha sido aislado de cepas con síntomas de enfermedades de madera, no podemos afirmar que se trate de un nuevo patógeno de vid, pues aún no se han realizado estudios de patogenicidad. Los cebadores descritos para la identificación de *C. destructans* permiten también amplificar ADN de *C. macrodidymum* y *C. liriodendri*, en cambio no permitieron amplificar ADN de *C. olidum*, por lo que se hace necesario la búsqueda de nuevos cebadores que permitan la amplificación de todas las especies del género *Cylindrocarpon*.

Por su parte los cebadores lata1 y lata2.2 (Lecomte y col., 2000), no permitieron la amplificación de todos los aislados identificados como *E. lata*. El análisis de la secuencia del amplímero ITS4/5 no permitió esclarecer la razón por la que no se produjo amplificación en alguno de los aislados puesto que sus secuencias solo se diferenciaron en función de una base en la zona de anillamiento de los cebadores, razón que no parece ser suficiente para justificarlo. En el año 2004, Rolshausen y colaboradores, diseñaron un sistema basado en PCR-RFLP para la identificación de los aislados de *E. lata* y su diferenciación respecto de otras especies de la familia Diatrypaceae, con el fin de mejorar la especificidad de los cebadores descritos por Lecomte y col. (2000).

La variabilidad existente entre los miembros de la familia Botryosphaeriaceae a nivel de la región ITS avalan la exclusión de *D. seriata*, *D. mutila*, *Do. sarmentorum*, *Do. iberica*, *Do. viticola* y *N. parvum* del género *Botryosphaeria*, reservado desde entonces para la especie *B. dothidea* entre las asociadas a los decaimientos de la vid en Castilla y León (Crous y col., 2006; Phillips y col., 2007). Se ha demostrado la existencia de una mayor homología a nivel de la región ITS entre las especies reubicadas en el género *Diplodia*, así como las reubicadas dentro del género *Dothiorella*. A la luz de los datos presentados, no ha sido posible una clara diferenciación entre los aislados de *Do. sarmentorum* y *Do. iberica*, en base a los patrones de restricción del amplímero ITS1/NL4 publicados por Alves y colaboradores (2005). La comparación de la región ITS tampoco permitió una clara diferenciación, al comparar sus secuencias con las presentes en la base de datos se estableció la identificación pero sólo en base a diferencias en un par de bases (homología 99-100%). Para la discriminación entre ambas especies sería más conveniente recurrir a la comparación de otras zonas del genoma como por ejemplo el factor de elongación 1 $\alpha$

cuya homología entre las especies *Do. iberica* y *Do. sarmentorum* oscila entre el 97-98%, debido principalmente a una delección de 9 pb.

Con el paso de los años han ido apareciendo nuevas especies de hongos en las parcelas de Castilla y León que ya habían sido descritas como patógenas de vid en otras zonas vitivinícolas; dentro de la familia Botryosphaeriaceae se han aislado *Do. sarmentorum*, *Do. iberica* y *Do. viticola* aunque en unos porcentajes poco representativos. Es importante destacar el hecho de que *N. parvum* se aísle casi exclusivamente en planta joven (54 % en planta joven frente al 2 % en planta adulta), por el contrario *D. mutila* sólo se aisló en planta adulta, pero en un porcentaje nada despreciable (46,6 %). Ante los datos presentados podemos admitir la hipótesis de que tal vez se estén introduciendo nuevas especies patógenas en nuestras parcelas, procedentes de viveros de otras regiones.

Según el R.D 208/2003 por el que se aprueba el Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de vid, el vivero deberá informar de la presencia por encima de unos límites mínimos de *Eutypa spp.*, *Phomopsis spp.* o *Stereum spp.*, sin embargo no hace referencia en ningún epígrafe a otras especies patógenas, ni establece unos límites mínimos ni aprueba una metodología de análisis. La insuficiente legislación que regula la sanidad de las plantas procedentes de los viveros dificulta el mantenimiento del buen estado sanitario de las parcelas. Hasta el momento no se ha aprobado una metodología de análisis que permita establecer unos límites mínimos de hongos patógenos en las plantas suministradas por los viveros, a diferencia de lo que ocurre con otros patógenos de vid como virus o bacterias. Mediante la metodología descrita en este capítulo basada en la PCR múltiple es posible detectar las principales especies patógenas de plantas jóvenes *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*. Esta metodología puede ser adaptada al análisis de muestras en los viveros, partiendo de muestras de plantas o de muestras de agua de los tanques distribuidos a lo largo del proceso de producción, como ya ha propuesto la Dra. Ángeles Aroca (Tesis doctoral, 2008). De la misma forma la metodología basada en RTi-PCR descrita en la presente memoria permite detectar hasta 1 fg de ADN ó 1 espora de *P. chlamydospora*, presentando el sistema un límite de detección de 100 y 25, fentogramos de ADN y esporas, respectivamente. Se ha demostrado la robustez del sistema obteniéndose unos valores de  $R^2$  de 0,998 para la detección de ADN y de 0,994 para la detección de esporas, mejorando los sistemas existentes de identificación de *P. chlamydospora* (Overton y col., 2004; Edwards y col., 2007).



Capítulo III  
Variabilidad genética de  
*Phaeomoniella chlamydospora*



## Introducción

*Phaeomoniella chlamydospora* es una de las especies que se aísla con mayor frecuencia de cepas con sintomatologías asociadas a hongos de la madera. Se encuentra asociado a la enfermedad de Petri en planta joven y a Yesca en planta adulta. *Phaeoacremonium chlamydosporum* fue descrito por Crous y col. (1996). Estudios taxonómicos llevados a cabo posteriormente (Crous y Gams, 2000) revelaron que las diferencias existentes entre aislados de *Phaeoacremonium chlamydosporum* y otras especies del género *Phaeoacremonium* eran suficientes como para considerarlo un nuevo género. Durante los últimos años grupos de investigación en todo el mundo han tratado de dilucidar el papel que desempeña *P. chlamydospora* en las enfermedades de la madera de vid. Aún no se conoce completamente la etiología de enfermedades como Yesca o Petri, pero se acepta la hipótesis de que estén provocadas por un complejo de hongos que desencadenan distintas infecciones provocando la necrosis de los vasos.

Según Mugnai y col. (1999) las esporas de *P. chlamydospora* penetran por los cortes de poda y las heridas; las chlamydosporas producidas por *P. chlamydospora* pueden persistir en el suelo posibilitando la infección del sistema radicular. Estudios llevados a cabo en viveros de distintos países han puesto de manifiesto que existe un alto porcentaje de cepas infectadas con *P. chlamydospora*, considerándose ésta, una de las vías de infección más importantes (Aroca y Raposo, 2005; Edwards y col., 2007) al igual que ocurre con especies del género *Cylindrocarpon* (Dubrovsky y Fabritius, 2007; Hamelin y col. 1996).

Una primera condición en estudios epidemiológicos o de poblaciones, es la correcta identificación del patógeno aislado. Para identificar especies de un mismo género se han propuesto diferentes sistemas taxonómicos, los cuales se basan principalmente en caracteres morfológicos, tales como tamaño y forma de conidios; formación de clamidosporas y estructura de conidióforos. Sin embargo, muchas veces, especies muy relacionadas entre sí difieren en un solo carácter, forma de la conidia o conidióforo, por ejemplo, lo que puede inducir a una mala identificación. Por otra parte, la aplicación de esta técnica tradicional es laboriosa y requiere de gran cantidad de material, lo que dificulta la identificación de un gran número de muestras a la vez que requiere de gran experiencia taxonómica para obtener resultados correctos.

Las técnicas moleculares, principalmente aquellas basadas en análisis de ADN, corresponden a metodologías más rápidas, precisas, objetivas y aplicables a un gran

número de muestras. Este tipo de metodologías permite diferenciar genotipos y de esta forma establecer la variabilidad genética existente dentro de una población (MacLean y col., 1993; Leung y col., 1993). Una metodología de análisis de ADN denominada RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Williams y col., 1990) genera patrones de bandas que corresponden a fragmentos de ADN, algunos de los cuales son compartidos por un grupo de genotipos, estando ausentes en otros. Este tipo de polimorfismo genético permite desarrollar marcadores moleculares para la identificación de individuos, realizar mapeo genómico y realizar estudios de genética de poblaciones (MacDonald, 1997).

En el caso del género *Fusarium*, se ha utilizado la metodología de RAPD para determinar la estructura de poblaciones de diversas formas especiales (Kelly y col., 1994; Woo y col., 1996; Vakalounoakis y Fragkiadakis, 1999). Esta metodología ha permitido encontrar marcadores moleculares para identificar especies tales como *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* (Schilling y col., 1996) o *F. poae* (Parry y Nicholson, 1996).

La diversidad genética de *Botrytis cinerea*, hongo responsable de la botritis o podredumbre gris en vid, fue estudiada por Thompson y Latorre (1999) utilizando RAPD-PCR en 29 aislados procedentes de cepas de Chile. Posteriormente Moyano y colaboradores (2003) estudiaron la variabilidad genética de *B. cinerea* en 44 aislados procedentes de distintos viveros de Almería mediante RAPD y AFLP.

Al igual que en los casos mencionados, la amplificación de secuencias polimórficas mediante RAPD ha permitido el estudio de la variabilidad genética existente entre las especies asociadas a los decaimientos de la vid. Pollastro y col. (2000) estudiaron la variabilidad genética existente entre especies del género *Fomitiporia* procedentes de distintas regiones de Italia. Tegli y col. (2000b) estudiaron la diversidad genética de *P. chlamydospora* entre 15 aislados italianos mediante RAPDs (randomly amplified polymorphic) o RAMs (randomly amplified microsatellite) llegando a la conclusión de que existe poca variabilidad entre los distintos aislados; conclusión que avala la hipótesis de que la reproducción de *P. chlamydospora* es predominantemente asexual (Tegli, S., 2000). Estudios similares fueron llevados a cabo en Francia (Peros y col., 2000; Borie y col., 2002) y en Nueva Zelanda (Pottinger y col., 2002). Peros y colaboradores estudiaron la diversidad genética en 126 aislados de *P. chlamydospora* procedentes de distintas regiones de Francia, en dicho trabajo identificaron 7 marcadores RAPDs obtenidos con 6 cebadores, llegando a las mismas

conclusiones. (Pottinger y col., 2002) en un estudio llevado a cabo con 39 aislados procedentes de Nueva Zelanda y 6 de Italia utilizando RAPDs, RAMs y AFLPs (amplified fragment length polymorphism) mostró una escasa variabilidad entre los distintos aislados. La presencia de variación entre aislados de una misma planta en Nueva Zelanda avala la existencia de múltiples vías de infección, punto que ya había sido demostrado en aislados franceses (Peros y col., 2000). Borie y colaboradores (2002) tampoco encontraron una gran variabilidad entre aislados de distintas zonas de Francia, corroborando los datos obtenidos años antes por Peros y colaboradores (2000).

Alves y colaboradores (2004) estudiaron la variabilidad genética de *P. chlamydospora* mediante rep-PCR (repetitive sequence-based polymerase chain reaction), técnica utilizada principalmente para el genotipado de especies procariotas, concluyendo que existe escasa variabilidad genética entre seis aislados portugueses y dos aislados de referencia procedentes de Italia y Sudáfrica.

Estudios moleculares de este tipo han permitido diseñar marcadores moleculares para la detección específica de *P. chlamydospora* en muestras de suelo, agua o madera mediante PCR convencional (Tegli y col., 2000a; Groenewald y col., 2001 y Ridgway y col., 2005).

La secuenciación de la región ITS ha proporcionado una valiosa información para la clasificación taxonómica de *P. chlamydospora* (Crous y Gams, 2000). Como ya se indicó en el Capítulo II esta región constituye uno de los fragmentos más utilizados a lo largo de los años para el estudio de filogenias debido a que posee zonas con tasa de evolución muy alta. En el presente capítulo además del estudio de la variabilidad genética presente en esta zona del genoma, se secuenciaron otras dos regiones:  $\beta$ -tubulina y factor de elongación 1  $\alpha$ , regiones habitualmente utilizadas para el estudio del genoma de ascomicetos filamentosos (O'Donell y Cigelnik, 1997; Glass y Donaldson, 1995; Carbone y Kohn, 1999).

## Materiales y métodos

### 1. Aislamiento y conservación de hongos.

El estudio de la variabilidad genética de *P. chlamydospora* se realizó con 35 aislados que se detallan en la Tabla 1. Del total de los aislados analizados, veintiuno procedían de doce cepas de las variedades Tempranillo, Verdejo, Juan García, Malvasía y Prieto Picudo recogidas durante los años 2004 y 2005 de parcelas de Castilla y León, con edades comprendidas entre 1 y 80 años; cinco de los aislados fueron obtenidos de plantas de vivero que no mostraron síntomas; cuatro fueron obtenidos de tres cepas jóvenes con síntomas, de la variedad Cencinel procedentes de Extremadura. Un aislado fue amablemente cedido por la Dra. R. Raposo (INIA, Madrid). LR9 y LR47 fueron cedidos desinteresadamente por el Dr. J.P. Péros (INRA, Villeneuve-les-Maguelone, Francia). Como referencia se utilizaron dos aislados obtenidos del *Centraalbureau voor schimmelcultures* (CBS, Utrecht, Holanda) *P. chlamydospora* CBS 161.90 procedente de Sudáfrica y CBS 239.74 de California. Como refleja la Tabla 1 de alguna de las plantas se analizaron más de un aislado.

Las muestras fueron recogidas y analizadas siguiendo la metodología descrita en el Capítulo I (Materiales y métodos, apartado 2: procesamiento de las muestras) de este trabajo. Los 35 aislados fueron cultivados en PDA (agar patata-dextrosa, Merck, Darmstadt, Alemania) en estufa a 25° C.

Isolates	Procedencia	Edad
CBS161.90	Sudáfrica	nd
CBS239.74	California, USA	nd
LR9	Assignan, France	nd
LR47	St Christol, France	nd
INIA56	Madrid	nd
V13-1	Castilla y León	Vivero
VR3-2	Castilla y León	Vivero
VR6-1	Castilla y León	Vivero
VR7-1	Castilla y León	Vivero
VR39	Castilla y León	Vivero
Y38-8-1	Castilla y León	> 20 años
Y41-2-2	Extremadura	1 año
Y80-6-1	Castilla y León	15-20 años
Y80-10-2		
Y82-11-4	Castilla y León	15-20 años
Y82-15-1		
Y83-8-1	Castilla y León	15-20 años
Y86-10-1	Castilla y León	15-20 años
Y87-5-3	Castilla y León	> 80 años
Y87-7-1		
Y87-9-1		
Y89-4-2	Castilla y León	< 5 años
Y89-7-1		
Y105-3-2	Extremadura	1 año
Y106-3-3	Extremadura	1 año
Y106-4-3		
Y112-42-3	Castilla y León	> 5 años
Y116-18-3	Castilla y León	> 50 años
Y116-35L-4		
Y119-8-5	Castilla y León	> 5 años
Y121-20L-1	Castilla y León	> 80 años
Y121-27L-1		
Y121-29-6		
Y122-3-6	Castilla y León	> 50 años
Y122-14-3		

Tabla 1. Aislados de *P. chlamydospora* utilizados en el análisis de variabilidad genética.

## 2. Extracción de ácidos nucleicos

Se sembraron placas de cada uno de los aislados con medio MEA suplementado con cloranfenicol, sobre el que se depositó una capa de celofán. Se repicó cada aislado encima del celofán de manera que, transcurrido el tiempo necesario para la obtención de suficiente masa de micelio, éste se recogió raspando la masa crecida por encima del celofán, que fue conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su liofilización. De cada población se analizaron tres cultivos monospóricos con el fin de estudiar la variabilidad intrapoblacional.

Las extracciones de ADN se realizaron a partir de micelio liofilizado y pulverizado con nitrógeno líquido en mortero, con Dneasy Plant mini Kit (QIAGEN, Colonia, Alemania). Los ácidos nucleicos obtenidos se diluyeron a una concentración de  $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ . Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp<sup>®</sup> 7200 (Applied Biosystems).

## 3. Análisis de patrones RAPDs

Cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de  $20\text{ }\mu\text{l}$  incluyendo  $0,5$  unidades de Taq polimerasa (Biotools Biotechnological and Mediacal Laboratorios S.A., Madrid, España),  $1\times$  Tampón suministrado con la enzima,  $1\text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $150\text{ }\mu\text{M}$  de cada dNTP,  $0,5\text{ }\mu\text{M}$  del cebador correspondiente y  $80\text{--}100\text{ ng}$  de ADN molde. Los ciclos de amplificación consistieron en desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$  durante  $5$  minutos, seguido de  $45$  ciclos de desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  durante  $1$  minuto, hibridación a  $34^{\circ}\text{C}$  durante  $1,5$  minutos y elongación de las cadenas a  $72^{\circ}\text{C}$  durante  $2$  minutos, seguidos de un paso de extensión final de  $72^{\circ}\text{C}$  durante  $10$  minutos.

La amplificación de cada aislado fue repetida un mínimo de  $2$  veces, y se incluyó una reacción sin ADN molde como control negativo. El volumen total de la reacción fue separado por electroforesis en geles de agarosa  $1\%$  en TBE. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

En un primer análisis se realizó una preselección de cebadores utilizando los  $20$  iniciadores OPERON (Operon technologies, La Jolla, California, USA) de las series OPA, OPC, OPD, y OPE con ADN de  $6$  aislados. Debido a su mayor variabilidad se seleccionaron los cebadores OPA-2,  $8$ ,  $11$  y  $16$ , OPC-8 y OPE-20 para el estudio con los  $35$  aislados de *P. chlamydospora* detallados en la Tabla 1. Para comprobar la homogeneidad intrapoblacional se compararon los patrones de varios aislados monospóricos de cada población.



El análisis de los marcadores RAPDs se realizó teniendo en cuenta las bandas reproducibles de mayor intensidad que presentaron variabilidad siendo puntuadas con 0 (ausentes) o 1 (presentes) para cada uno de los aislados monospóricos estudiados. A partir de los datos binarios se construyó un dendrograma con Treecon 1.3b (Van de Peer and De Wachter, 1994) basado en el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979).

#### **4. Análisis de secuencias**

Se seleccionaron tres regiones del genoma de *P. chlamydospora* para el estudio de la variabilidad genética existente entre los 35 aislados analizados: DNA ribosómico,  $\beta$ -tubulina y factor de elongación  $1\alpha$ . Todos los cebadores utilizados fueron suministrados por IZASA (Barcelona, España). Las reacciones de amplificación se realizaron con REDExtract-N-Amp Kit (XNAP) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras la amplificación se cargaron 5  $\mu$ l de cada reacción en geles de agarosa al 1% en TBE. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

Los fragmentos amplificados fueron purificados mediante GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) y secuenciados por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León mediante DYEnamic ET Dye terminator Kit (MegaBACE, Amersham) en un termociclador MJ Research PTC-200. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con MEGABACE 500 (Amersham) y corregidas con Chromas v1.45. Los alineamientos se realizaron con Clustal X 1.83 y fueron modificados manualmente cuando fue necesario. A partir de los alineamientos obtenidos se construyeron los árboles filogenéticos correspondientes con el programa MEGA 4.

##### **4.1. Variabilidad de *P. chlamydospora* en la región ITS.**

Se analizaron las secuencias del DNAr 5.8S y las regiones ITS que lo flanquean (ITS1 e ITS2) amplificadas con los cebadores ITS4 e ITS5 descritos por White y col. (1990). Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, hibridación a 58° C durante 1 minuto, y extensión a 72° C durante 1 minuto, concluyendo con un paso de extensión final a 72° C durante 10 minutos.

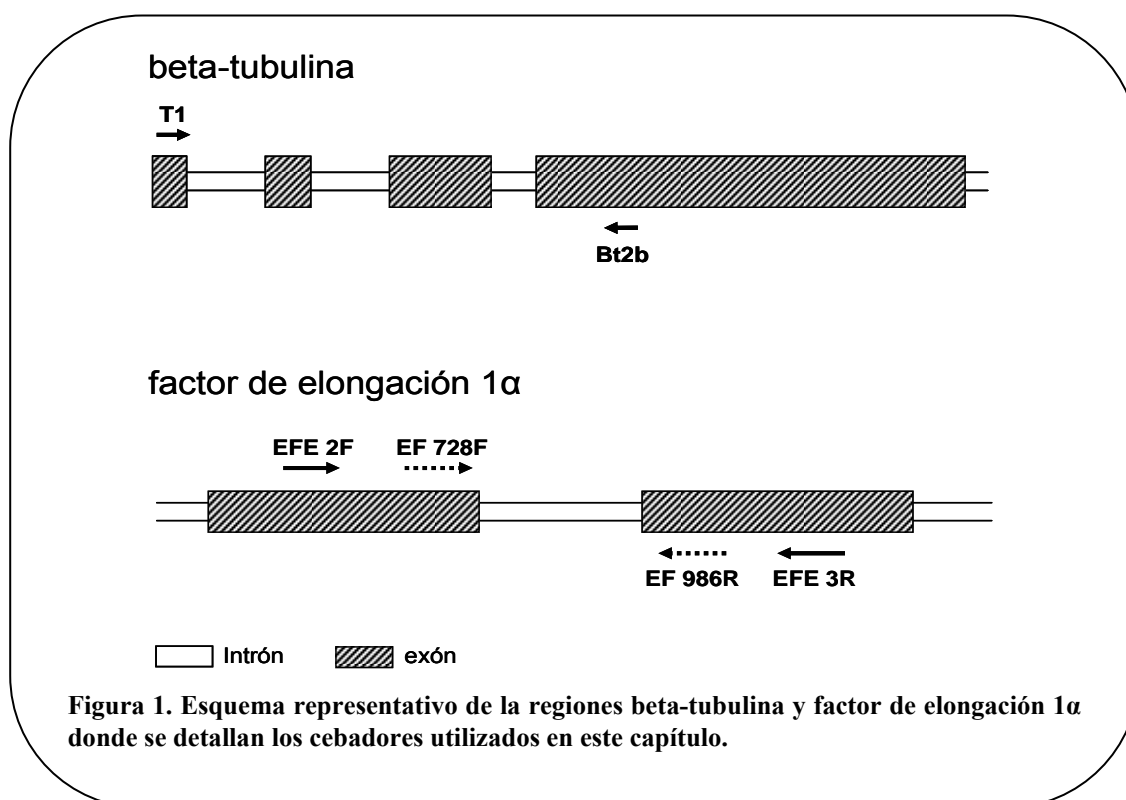
#### 4.2. Variabilidad de *P. chlamydospora* en el gen de la $\beta$ -tubulina.

Se amplificaron los exones 2 al 6 del gen de la  $\beta$ -tubulina con los iniciadores T1 (O'Donell y Cigelnik, 1997) y Bt-2b (Glass y Donalson, 1995) (Figura 1), siguiendo el mismo procedimiento que para la región ITS. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos, seguido de 32 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 56° C y 1 minuto a 72° C, finalizando con un paso de extensión a 72° C durante 10 minutos.

#### 4.3. Variabilidad de *P. chlamydospora* en el factor de elongación 1 $\alpha$ .

La amplificación se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente con los iniciadores EF-728F y EF1-986R descritos por Carbone y Kohn (1999). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos, seguido de 32 ciclos de 30 segundos a 94° C, 45 segundos a 53° C y 90 segundos a 72° C, finalizando con un paso de extensión a 72° C durante 10 minutos.

Se diseñaron dos nuevos iniciadores para la amplificación de un fragmento de mayor tamaño (Figura 1): EFE-2F y EFE-3R (5'-TGATCTACAAGTGCGGTGGT-3' y 5'-GGGCGATATCGATGGTGATA-3') (Cobos y Martín, 2008). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95° C, seguido de 25 ciclos de 1 minuto a 94° C, 30 segundos a 58° C y 1 minuto a 72° C, con un paso de extensión final de 10 minutos a 72° C.



## Resultados

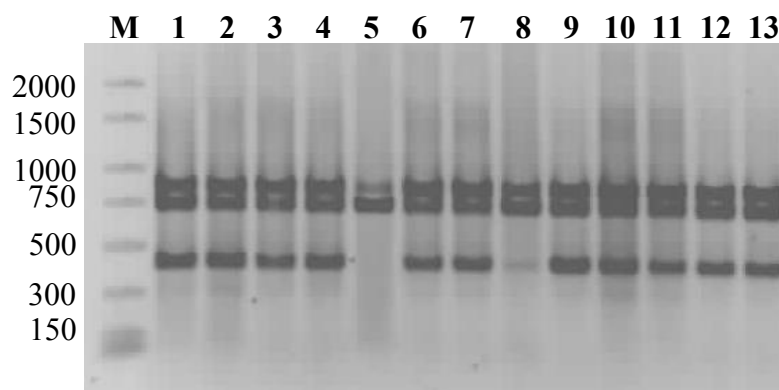
### 1. Análisis de patrones RAPDs

Se realizó una preselección con los 20 cebadores de las series OPA, OPC, OPD, OPE. Se seleccionaron 6 cebadores por su mayor variabilidad y se analizaron las 35 muestras según se describe en el apartado de materiales y métodos de este capítulo. Los cebadores seleccionados fueron: OPA-2, OPA-8, OPA-11, OPA-16, OPC-8 y OPE-20. Con tres de ellos se obtuvieron 4 bandas polimórficas que se confirmaron en las distintas repeticiones, permitiendo diferenciar hasta 9 grupos fenotípicos distintos.

#### 1.1. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPA-2.

La amplificación aleatoria de fragmentos de ADN mediante el cebador OPA-2 proporcionó patrones similares en todas las muestras ensayadas, obteniéndose tres bandas de aproximadamente 900 pb, 750 pb y 450 pb (Figura 2). La única banda que mostró variabilidad en las distintas muestras fue la correspondiente a 450 pb, en alguno de los aislados no se amplificó dicho fragmento (carril 5, Figura 2) pero este resultado no se confirmó en las distintas repeticiones.

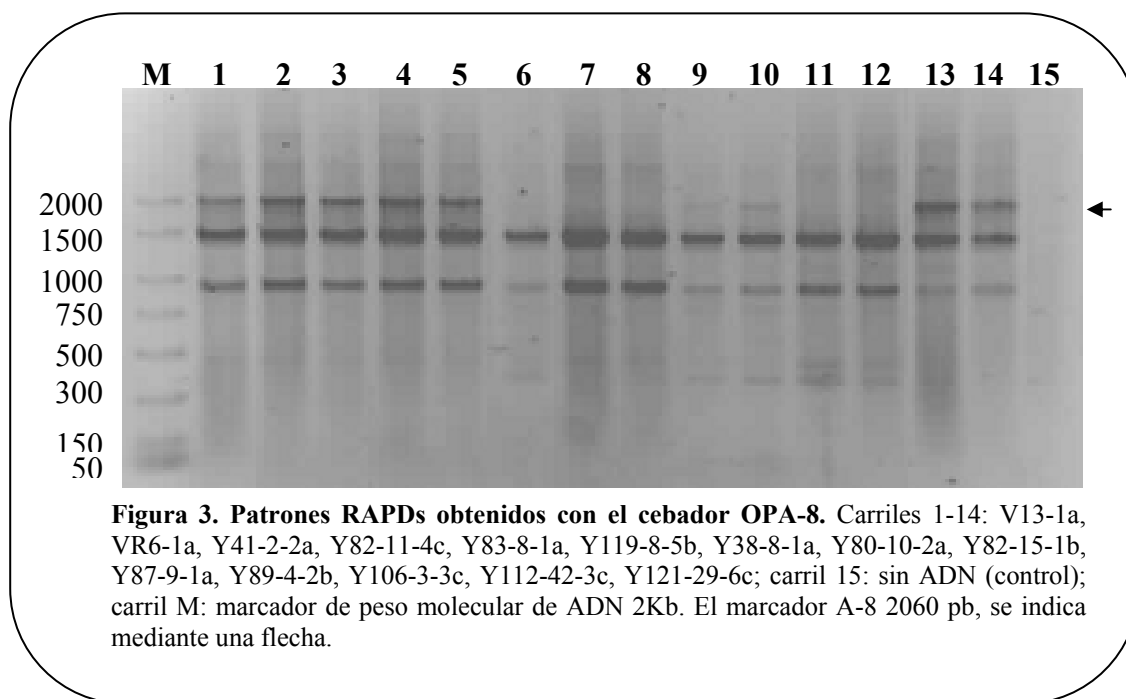
La escasa variabilidad obtenida con este cebador no permitió establecer grupos diferenciados entre los distintos aislados ensayados.



**Figura 2. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPA-2.** Carriles 1-13: *P.chlamydospora* CBS 161.90b, VR6-1b, Y38-8-1a, Y41-2-2a, V13-1c, Y80-10-2-a, Y82-11-4b, VR39c, Y83-8-1a, Y87-7-1a, Y82-15-1c, Y87-5-3c, Y80-6-1b; carril M: marcador de peso molecular de ADN 2Kb.

### 1.2. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPA-8.

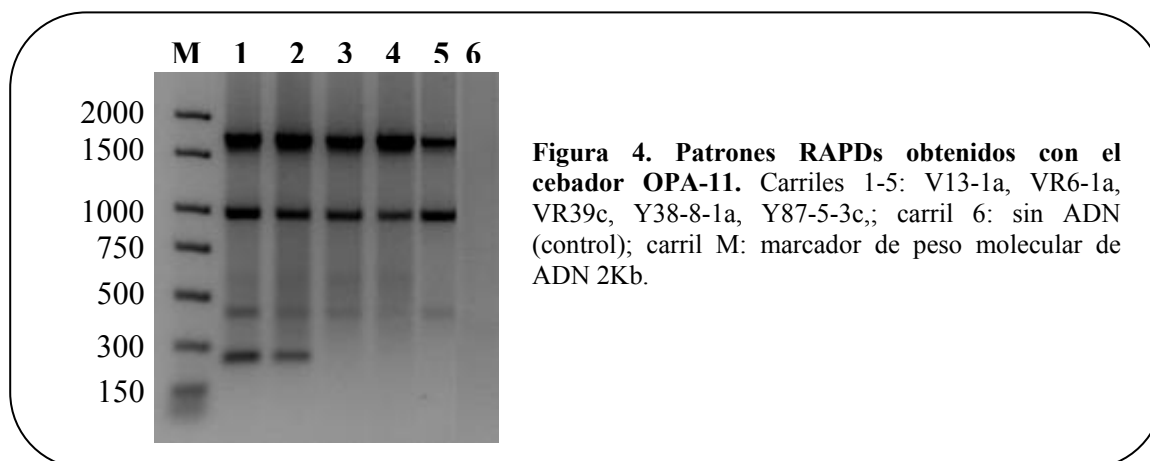
El cebador OPA-8 permitió amplificar 3 bandas de 2060 pb, 1500 pb y 950 pb (Figura 3). La banda polimórfica de 2060 pb apareció en 22 de los 35 aislados ensayados y fue considerada como uno de los marcadores de variabilidad (marcador A-8 2060 pb).



### 1.3. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPA-11

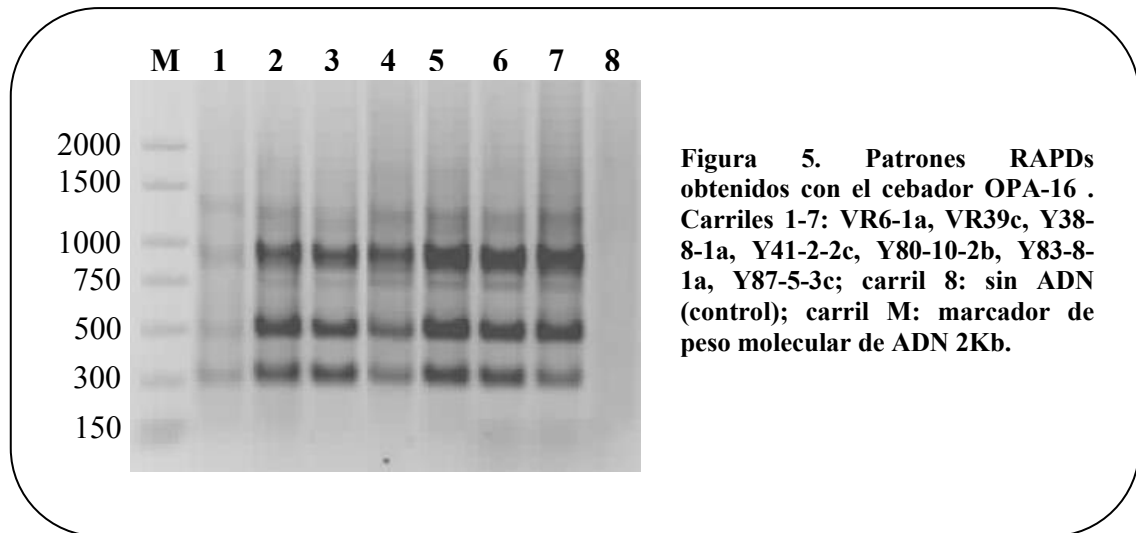
La amplificación de ADN de *P. chlamydospora* con el cebador OPA-11 proporcionó 2 bandas intensas de aproximadamente 1600 pb y 1000 pb en todos los aislados ensayados (Figura 4).

En algunos de los aislados aparecieron bandas de menor tamaño (aproximadamente 250 pb) pero no resultaron ser reproducibles, ya que no aparecieron en las distintas repeticiones por lo que no se tuvieron en cuenta en el análisis de variabilidad.



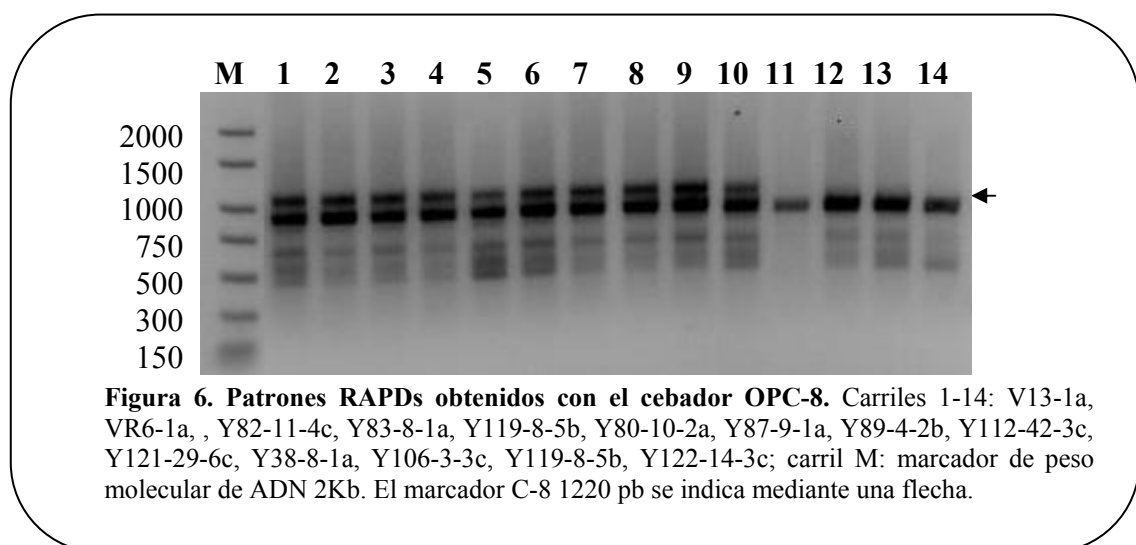
#### 1.4. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPA-16.

La amplificación con el cebador OPA-16 dió como resultado la amplificación de tres bandas intensas de aproximadamente 950 pb, 500 pb y 300 pb, que se obtuvieron en todos los aislados de *P. chlamydospora* ensayados (Figura 5). Al igual que ocurrió con los cebadores OPA-2 y OPA-11, las bandas obtenidas no permitieron establecer patrones diferenciales entre los distintos aislados.



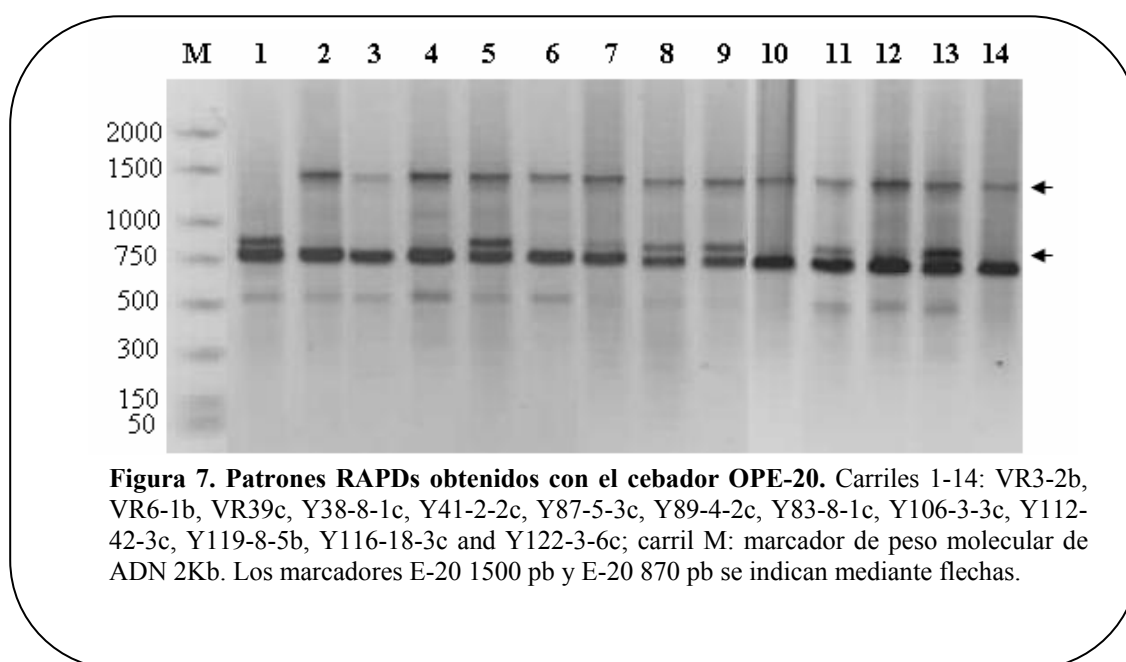
#### 1.5. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPC-8.

El cebador OPC-8 permitió amplificar 2 bandas intensas de aproximadamente 1200 pb y 900 pb (Figura 6). La banda de mayor tamaño fue amplificada en 29 de los 35 aislados de *P. chlamydospora* ensayados, y fue considerada como un marcador de variabilidad (marcador C-8 1220 pb).



### 1.6. Patrones RAPDs obtenidos con el cebador OPE-20.

Mediante el cebador OPE-20 se obtuvieron distintos patrones de amplificación en los 35 aislados de *P. chlamydospora* ensayados. Se amplificaron un total de tres bandas intensas con pesos moleculares aproximados de 1500 pb, 870 pb y 750 pb (Figura 7). Tan sólo la banda de 750 pb apareció en todos los aislados analizados. Las otras dos bandas constituyeron marcadores de variabilidad denominados E-20 1500 pb y E-20 870 pb.



## 2. Variabilidad de *P. chlamydospora* en la región ITS

La amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 con los cebadores ITS5 e ITS4 proporcionó un fragmento de 650pb. La comparación de las secuencias de los 35 aislados amplificados pusieron de manifiesto la existencia de una escasa variabilidad. La Figura 8 representa el alineamiento de 529 pb correspondientes a la región ITS de seis aislados de *P. chlamydospora* utilizados en los estudios de variabilidad. La homología entre las secuencias osciló entre el 99-100 % diferenciándose las distintas secuencias tan sólo en dos pares de bases situadas en las posiciones 369 y 438.

Y112-42-3	GATCATTATCGAGTCAGG-TCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCCTTTGTTTATCATACCTT	59
Y116-18-3	GATCATTATCGAGTCAGG-TCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCCTTTGTTTATCATACCTT	59
Y86-10-1	GATCATTATCGAGTCAGGTCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCCTTTGTTTATCATACCTT	60
Y83-8-1	GATCATTATCGAGTCAGG-TCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCCTTTGTTTATCATACCTT	59
87-9-1	GATCATTATCGAGTCAGG-TCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCCTTTGTTTATCATACCTT	59
Y121-20-1	GATCATTATCGAGTCAGG-TCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCCTTTGTTTATCATACCTT	59
*****		
Y112-42-3	TGTTGCTTTGGCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTTTCAGTCGCCTCTGGCCAG	119
Y116-18-3	TGTTGCTTTGGCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTTTCAGTCGCCTCTGGCCAG	119
Y86-10-1	TGTTGCTTTGGCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTTTCAGTCGCCTCTGGCCAG	120
Y83-8-1	TGTTGCTTTGGCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTTTCAGTCGCCTCTGGCCAG	119
87-9-1	TGTTGCTTTGGCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTTTCAGTCGCCTCTGGCCAG	119
Y121-20-1	TGTTGCTTTGGCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTTTCAGTCGCCTCTGGCCAG	119
*****		
Y112-42-3	CGTCTGCCAGTAGCCCAACCAAAATCTTTGTTACATGTGACGTCTGAACGGTTCCATCA	179
Y116-18-3	CGTCTGCCAGTAGCCCAACCAAAATCTTTGTTACATGTGACGTCTGAACGGTTCCATCA	179
Y86-10-1	CGTCTGCCAGTAGCCCAACCAAAATCTTTGTTACATGTGACGTCTGAACGGTTCCATCA	180
Y83-8-1	CGTCTGCCAGTAGCCCAACCAAAATCTTTGTTACATGTGACGTCTGAACGGTTCCATCA	179
87-9-1	CGTCTGCCAGTAGCCCAACCAAAATCTTTGTTACATGTGACGTCTGAACGGTTCCATCA	179
Y121-20-1	CGTCTGCCAGTAGCCCAACCAAAATCTTTGTTACATGTGACGTCTGAACGGTTCCATCA	179
*****		
Y112-42-3	AAATCAAACCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG	239
Y116-18-3	AAATCAAACCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG	239
Y86-10-1	AAATCAAACCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG	240
Y83-8-1	AAATCAAACCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG	239
87-9-1	AAATCAAACCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG	239
Y121-20-1	AAATCAAACCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG	239
*****		
Y112-42-3	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA	299
Y116-18-3	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA	299
Y86-10-1	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA	300
Y83-8-1	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA	299
87-9-1	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA	299
Y121-20-1	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA	299
*****		
Y112-42-3	CATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCAACCCTCAA	359
Y116-18-3	CATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCAACCCTCAA	359
Y86-10-1	CATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCAACCCTCAA	360
Y83-8-1	CATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCAACCCTCAA	359
87-9-1	CATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCAACCCTCAA	359
Y121-20-1	CATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCAACCCTCAA	359
*****		
Y112-42-3	GCCCGGCTTGTTATTGGGTCCATATCAACTTTCATAGAAGATAGGCCCGAAAGATAATGG	419
Y116-18-3	GCCCGGCTTGTTATTGGGTCCATATCAACTTTCATAGAAGATAGGCCCGAAAGATAATGG	419
Y86-10-1	GCCCGGCTTGTTATTGGGTCCATATCAACTTTCATAGAAGATAGGCCCGAAAGATAATGG	420
Y83-8-1	GCCCGGCTTGATATTGGGTCCATATCAACTTTCATAGAAGATAGGCCCGAAAGATAATGG	419
87-9-1	GCCCGGCTTGATATTGGGTCCATATCAACTTTCATAGAAGATAGGCCCGAAAGATAATGG	419
Y121-20-1	GCCCGGCTTGATATTGGGTCCATATCAACTTTCATAGAAGATAGGCCCGAAAGATAATGG	419
*****		
Y112-42-3	CGGCGTCAAGAATGACCCCTAGGTGCAGCGAGCAATCAAGCATACTGAGGTGGTCCCTCT	479
Y116-18-3	CGGCGTCAAGAATGACCCCTAGGTGCAGCGAGCAATCAAGCATACTGAGGTGGTCCCTCT	479
Y86-10-1	CGGCGTCAAGAATGACCCCTAGGTGCAGCGAGCAATCAAGCATACTGAGGTGGTCCCTCT	480
Y83-8-1	CGGCGTCAAGAATGACCCCTAGGTGCAGCGAGCAATCAAGCATACTGAGGTGGTCCCTCT	479
87-9-1	CGGCGTCAAGAATGACCCCTAGGTGCAGCGAGCAATCAAGCATACTGAGGTGGTCCCTCT	479
Y121-20-1	CGGCGTCAAGAATGACCCCTAGGTGCAGCGAGCAATCAAGCATACTGAGGTGGTCCCTCT	479
*****		
Y112-42-3	TGGCCTGGCCCTATTGTTTTGTTGCAGAACTCTCAGGTTGACCTCGGAT	528
Y116-18-3	TGGCCTGGCCCTATTGTTTTGTTGCAGAACTCTCAGGTTGACCTCGGAT	528
Y86-10-1	TGGCCTGGCCCTATTGTTTTGTTGCAGAACTCTCAGGTTGACCTCGGAT	529
Y83-8-1	TGGCCTGGCCCTATTGTTTTGTTGCAGAACTCTCAGGTTGACCTCGGAT	528
87-9-1	TGGCCTGGCCCTATTGTTTTGTTGCAGAACTCTCAGGTTGACCTCGGAT	528
Y121-20-1	TGGCCTGGCCCTATTGTTTTGTTGCAGAACTCTCAGGTTGACCTCGGAT	528
*****		

Figura 8. Alineamiento de secuencias correspondientes a la región ITS de 6 aislados de *P. chlamydospora*

El dendrograma resultante del alineamiento anterior permitió establecer dos grupos en función de las bases presentes en las posiciones 369 y 438 (Figura 9):

- grupo I formado por 14 aislados con Timina en ambas posiciones,
- grupo II formado por 21 aislados con Adenina en posición 369 y Citosina en posición 438.

El aislado Y86-10-1 presentó una Guanina adicional en la posición 19 (Figura 8) que no se repitió en el resto de aislados analizados. En el dendrograma se incluyó una secuencia de *Phaeoacremonium aleophilum* obtenida de la base de datos NCBI (DQ404356.1).

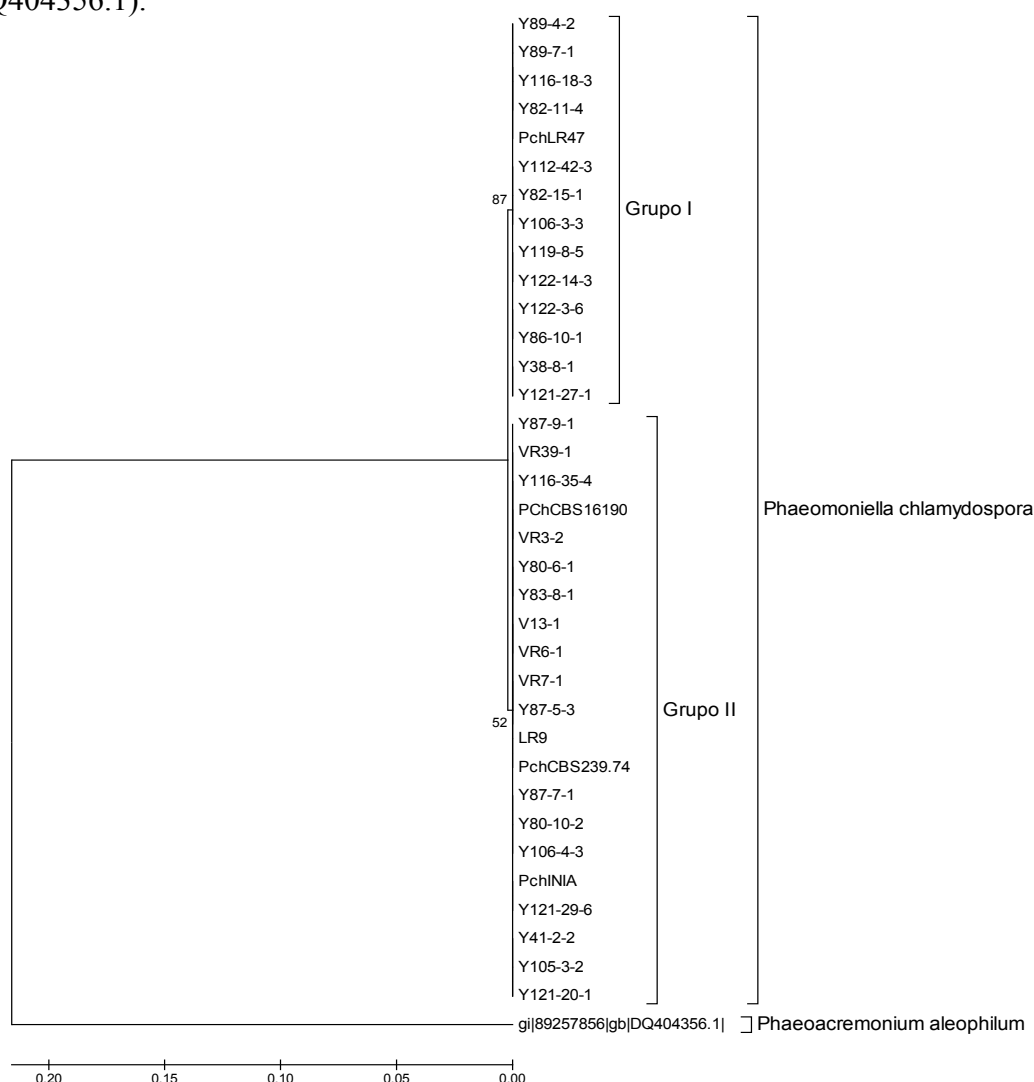


Figura 9. Dendrograma generado a partir del alineamiento de secuencias de la región ITS de 35 aislados de *P. chlamydospora*.

### 3. Variabilidad de *P. chlamydospora* en la $\beta$ -tubulina

La amplificación de los exones 1 al 6 de la  $\beta$ -tubulina con los cebadores T1 y Bt2b proporcionó un fragmento de 550 pb. El alineamiento de las secuencias obtenidas puso de manifiesto la existencia de un porcentaje de homología del 100%.



#### 4. Variabilidad de *P. chlamydospora* en el factor de elongación 1 $\alpha$

Cuando la amplificación de los exones 2-3 del gen del factor de elongación 1 $\alpha$  se realizó con los cebadores descritos por Carbone y col. EF1-728F y EF1-986R a una temperatura de hibridación de 58° C, no se produjo amplificación en ninguno de los aislados. La disminución de la temperatura de anillamiento hasta 53° C, favoreció la amplificación de un fragmento de 180 pb, que no guardó homología con ninguna secuencia de la base de datos. A partir de la comparación de secuencias del factor de elongación 1 $\alpha$  de distintas especies de hongos presentes en la base de datos GenBank se diseñaron otro par de oligonucleótidos iniciadores (EFE2F y EFE3R) que permitieron amplificar un fragmento de 337 pb (Figura 10). Las secuencias obtenidas para los 35 aislados se alinearon resultando una homología del 99-100%. Se diferenciaron dos grupos en función del nucleótido presente en la posición 294 (Citosina o Timina).

```

Y83-8-1      CCCCTTGATCTACAAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT 60
Y87-9-1      CCCCTTGATCTACAAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT 60
Y121-20-1    CCCCTTGATCTACAAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT 60
Y116-18-3    CCCCTTGATCTACAAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT 60
Y86-10-1     CCCCTTGATCTACAAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT 60
Y112-42-3    CCCCTTGATCTACAAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGT 60
*****

Y83-8-1      ATGACTTCCACCCTCATTATCACATTTTGTGTCCTTATCGCCGCCTGTGTGAAAAATTTTG 120
Y87-9-1      ATGACTTCCACCCTCATTATCACATTTTGTGTCCTTATCGCCGCCTGTGTGAAAAATTTTG 120
Y121-20-1    ATGACTTCCACCCTCATTATCACATTTTGTGTCCTTATCGCCGCCTGTGTGAAAAATTTTG 120
Y116-18-3    ATGACTTCCACCCTCATTATCACATTTTGTGTCCTTATCGCCGCCTGTGTGAAAAATTTTG 120
Y86-10-1     ATGACTTCCACCCTCATTATCACATTTTGTGTCCTTATCGCCGCCTGTGTGAAAAATTTTG 120
Y112-42-3    ATGACTTCCACCCTCATTATCACATTTTGTGTCCTTATCGCCGCCTGTGTGAAAAATTTTG 120
*****

Y83-8-1      GTGGGGGCGGGGCTCTCAAAACGACCCTTGCTTCACCGCAATGCTCTCCACCAACCATAT 180
Y87-9-1      GTGGGGGCGGGGCTCTCAAAACGACCCTTGCTTCACCGCAATGCTCTCCACCAACCATAT 180
Y121-20-1    GTGGGGGCGGGGCTCTCAAAACGACCCTTGCTTCACCGCAATGCTCTCCACCAACCATAT 180
Y116-18-3    GTGGGGGCGGGGCTCTCAAAACGACCCTTGCTTCACCGCAATGCTCTCCACCAACCATAT 180
Y86-10-1     GTGGGGGCGGGGCTCTCAAAACGACCCTTGCTTCACCGCAATGCTCTCCACCAACCATAT 180
Y112-42-3    GTGGGGGCGGGGCTCTCAAAACGACCCTTGCTTCACCGCAATGCTCTCCACCAACCATAT 180
*****

Y83-8-1      TTCATCACTGCGATAAGCTTGTCAATTCAAAAAGCTCATCACTGACTGTTCTCAATAGGAA 240
Y87-9-1      TTCATCACTGCGATAAGCTTGTCAATTCAAAAAGCTCATCACTGACTGTTCTCAATAGGAA 240
Y121-20-1    TTCATCACTGCGATAAGCTTGTCAATTCAAAAAGCTCATCACTGACTGTTCTCAATAGGAA 240
Y116-18-3    TTCATCACTGCGATAAGCTTGTCAATTCAAAAAGCTCATCACTGACTGTTCTCAATAGGAA 240
Y86-10-1     TTCATCACTGCGATAAGCTTGTCAATTCAAAAAGCTCATCACTGACTGTTCTCAATAGGAA 240
Y112-42-3    TTCATCACTGCGATAAGCTTGTCAATTCAAAAAGCTCATCACTGACTGTTCTCAATAGGAA 240
*****

Y83-8-1      GCTGCTGAACTCGGAAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTTGGACAAGCTCAAGGCC 300
Y87-9-1      GCTGCTGAACTCGGAAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTTGGACAAGCTCAAGGCC 300
Y121-20-1    GCTGCTGAACTCGGAAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTTGGACAAGCTCAAGGCC 300
Y116-18-3    GCTGCTGAACTCGGAAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTTGGACAAGCTCAAGGCC 300
Y86-10-1     GCTGCTGAACTCGGAAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTTGGACAAGCTCAAGGCC 300
Y112-42-3    GCTGCTGAACTCGGAAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTTGGACAAGCTCAAGGCC 300
*****

Y83-8-1      GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATCGCCCAA 337
Y87-9-1      GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATCGCCCAA 337
Y121-20-1    GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATCGCCCAA 337
Y116-18-3    GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATCGCCCAA 337
Y86-10-1     GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATCGCCCAA 337
Y112-42-3    GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATCGCCCAA 337
*****

```

Figura 10. Alineamiento de secuencias correspondientes factor de elongación 1 $\alpha$  de 6 aislados de *P. chlamydospora*

### 5. Análisis de la variabilidad genética de *P. chlamydospora*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir del análisis de patrones de bandas mediante amplificación de fragmentos de ADN al azar con los cebadores OPA-8, OPC-8 y OPE-20, así como el análisis de las secuencias correspondientes a tres regiones distintas del genoma de *P. chlamydospora*, se elaboró un dendrograma que puso de manifiesto la variabilidad existente entre los distintos aislados (Figura 10).

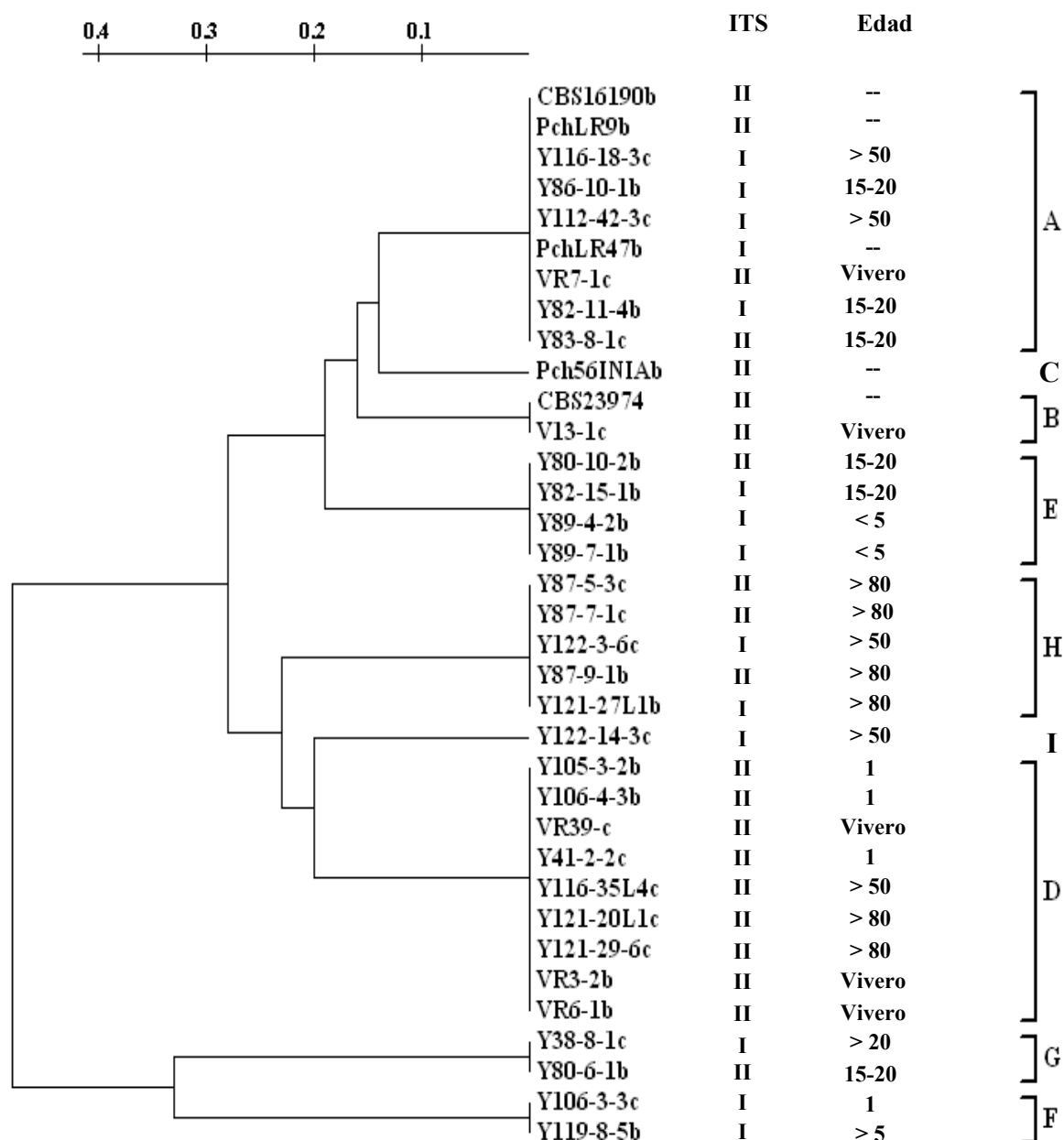


Figura 11. Dendrograma representativo de la variabilidad genética de *P. chlamydospora* construido a partir de los datos obtenidos mediante RAPD.

A partir de los patrones de bandas obtenidos mediante RAPD se diferenciaron 9 grupos de homología (A-I). La mayoría de los aislados se agruparon en A y D. El grupo A formado por 9 aislados entre los que se incluyen el aislado de referencia CBS161.90b y los dos aislados franceses PchLR9b y PchLR47b, incluyeron aislados procedentes de cepas de todas las edades, al igual que el grupo D, pero en este último todos los aislados presentaron patrón ITS del grupo II. Por el contrario, el grupo E sólo lo forman plantas de menos de 20 años y en el grupo H todos los aislados pertenecen a plantas con más de 50 años. Merece la pena destacar la existencia de variabilidad de patrones dentro de una misma planta, que puede ponerse de manifiesto en el análisis de los aislados procedentes de las cepas Y80, Y82, Y106, Y116, Y121 e Y122. En cambio todos los aislados analizados de las cepas Y87 e Y89 presentaron los mismos patrones RAPDs y mismo grupo ITS.

De los 35 aislados analizados se seleccionaron 6, cuyas secuencias correspondientes a la región ITS,  $\beta$ -tubulina y factor de elongación 1  $\alpha$  fueron introducidas en la base de datos GenBank. Los números de acceso se detallan en la Tabla 2.

Aislado	ITS	$\beta$ -tubulina	factor de elongación 1- $\alpha$
Y83-8-1	EU018412	EU078329	EU158820
Y86-10-1	EU018413	EU078334	EU158821
Y87-9-1	EU018414	EU078330	EU158822
Y112-42-3	EU018415	EU078332	EU158823
Y116-18-3	EU018416	EU078331	EU158824
Y121-20-1	EU018417	EU078333	EU158825

**Tabla 2.** Números de acceso a la base de datos Genbank de las distintas regiones secuenciadas para seis aislados de *P. chlamydospora*.

## Discusión

El estudio de la variabilidad genética de los microorganismos proporciona una valiosa herramienta para el conocimiento y diagnóstico precoz de los mismos, permitiendo determinar la clasificación de cada organismo, así como las relaciones filogenéticas existentes entre microorganismos próximos. Estudios basados en las diferencias existentes entre las secuencias de  $\beta$ -tubulina y la región ITS de aislados de *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* permitieron a Groenewald y col. (2001) corroborar los datos publicados un año antes por Crous y Gams (2000). En dicho trabajo ambos autores describieron el género *Phaeomoniella*, cuya especie *P. chlamydospora* divergía tanto morfológica como molecularmente del resto de las especies del género *Phaeoacremonium*.

Tegli y col. (2000b) estudiaron la variabilidad genética existente entre 15 aislados de *P. chlamydospora* y 29 de *P. aleophilum* procedentes de ocho regiones italianas mediante amplificación aleatoria de fragmentos de ADN polimórficos (RAPD) y amplificación aleatoria de micro o minisatélites (RAMS) no encontrando ninguna similitud entre los aislados de una región que permitiera diferenciarlos de los de otras regiones, a pesar de detectar un total de 18 fragmentos polimórficos en los aislados de *P. chlamydospora* a partir del estudio de los patrones de 4 cebadores RAPD diferenciando un total de 24 genotipos. Borie y col. (2002) estudiaron la variabilidad existente entre 164 aislados de *P. chlamydospora* procedentes de distintas regiones de Francia, 47 de los cuales procedían de una única parcela, obteniendo polimorfismos con tan sólo 6 cebadores RAPD. Mostert y col. (2006) analizaron 88 aislados procedentes de 8 países mediante la amplificación de fragmentos de longitud variable (AFLP), obteniendo 138 marcadores con tan sólo dos combinaciones de cebadores, el 33% de los cuales resultaron ser polimórficos. En todos estos trabajos concluyeron que existe una escasa variabilidad genética entre los aislados de *P. chlamydospora*, lo que parece apuntar hacia la existencia de reproducción asexual.

En el presente trabajo hemos abordado el estudio de la variabilidad intraespecífica de *P. chlamydospora* en aislados españoles, mediante la utilización de marcadores RAPD así como a partir de la secuenciación de tres zonas del genoma: ADN ribosómico,  $\beta$ -tubulina y factor de elongación  $1\alpha$ .

De los 20 cebadores RAPD utilizados, tan sólo tres permitieron identificar 4 fragmentos polimórficos (marcadores RAPD: A-8 2060, C-8 1220, E-20 1500 y E-20 870 pb) que dividieron los 35 aislados de *P. chlamydospora* en 9 grupos de homología (A-I). Como cabía esperar, los aislados procedentes de una misma planta presentaron el mismo patrón (plantas Y87 e Y89), sin embargo, seis muestras presentaron aislados con distintos patrones (Y80, Y82, Y106, Y116, Y121 e Y122), lo que pone de manifiesto la existencia de distintos focos de infección en una misma planta. A pesar de las escasos aislados procedentes de otras regiones, los datos presentados no muestran una agrupación de los aislados en función de la procedencia geográfica.

El ADN ribosómico es una zona de gran importancia desde el punto de vista filogenético por ser una región muy conservada dentro de cada especie, a la vez que permite diferenciar distintas especies dentro de un mismo género (Tegli y col. 2000a). En el presente trabajo se ha observado la escasa variabilidad existente en esta zona del genoma de *P. chlamydospora* cuyos aislados tan sólo se diferenciaron en dos pares de bases de un total de 528 pb amplificadas, dicha variabilidad permitió establecer dos grupos. Al igual que en la variabilidad descrita a partir de los patrones RAPD no todos los aislados de una misma planta se encuadraron en el mismo grupo. Como ejemplo podemos señalar la planta Y106, cuyos dos aislados pertenecen a distintos grupos de homología (Y106-3-3c grupo de homología I-F e Y106-4-3b grupo I-D), o los tres aislados de la planta Y121, dos de los cuales pertenecen al grupo II-D (Y121-20L-1c e Y121-29-6c) y otro al grupo I-H (Y121-27L-1b). En el caso de las plantas Y80 e Y86, a pesar de que sus aislados poseen patrón RAPD distintos, pertenecen al mismo grupo de homología ITS (Y80 al grupo II e Y86 al grupo I).

Los fragmentos de  $\beta$ -tubulina y factor de elongación presentaron una homología del 100% entre todos los aislados ensayados, lo que confirma la consistencia del género *Phaeomoniella*, descrito por Crous y Gams (2000) y corroborado por los datos publicados por Groenewald y col. (2001) a partir del estudio de la región ITS y  $\beta$ -tubulina. Según nuestro conocimiento, el presente capítulo constituye el primer estudio del factor de elongación 1 $\alpha$  en *Phaeomoniella chlamydospora*, y a pesar de carecer de importancia desde el punto de vista de la variación intraespecífica, debería ser tenido en cuenta como una zona de gran importancia para el estudio de variabilidad entre especies de un mismo género.



Capítulo IV

**Medios de control**

Ensayo con fungicidas comerciales





## Introducción

Desde la prohibición del arsenito sódico grupos de investigación en todo el mundo en colaboración con empresas químicas dedicadas a la síntesis de nuevas materias activas, trabajan en la búsqueda de fungicidas que permitan hacer frente a los hongos asociados a las enfermedades de la madera de la vid. Jaspers (2001) ensayó *in vitro* el efecto de 22 materias activas frente a tres aislados de *Phaeomoniella chlamydospora*. El estudio se realizó teniendo en cuenta tanto el efecto sobre el crecimiento de micelio como la germinación de las esporas, concluyendo que los fungicidas sistémicos ensayados fueron más efectivos frente al crecimiento del micelio, mientras que los fungicidas de contacto mostraron mayor actividad frente a la germinación de las esporas.

En un estudio sobre la enfermedad de Petri realizado en Australia por Laukart y col. (2001), se ensayó la actividad de 8 fungicidas sobre *Phaeomoniella chlamydospora*. Los fungicidas se aplicaron mediante pulverización foliar (Benomilo, Benzothiodiazol, Fenamirol, Kresoxim-methylo, Phosponato, Prochloraz, Tebuconazol, Triadimenol) y también se realizó un tratamiento de termoterapia, en plantas enraizadas de Pinot Noir de un año de edad, infectadas con *Phaeomoniella chlamydospora* en invernadero. La valoración de los síntomas se realizó en base a la presencia de necrosis vasculares longitudinales y manchas oscuras en los cortes transversales de la madera. Las plantas se analizaron 22 semanas después de haber sido plantadas. Todos los tratamientos disminuyeron significativamente la incidencia de los puntos oscuros. El tratamiento con Phosphonato fue el más eficaz mientras que el Benzothiodiazol fue el menos efectivo con respecto al control de *Phaeomoniella chlamydospora*.

En Portugal Rego y col. (2006) realizaron un estudio sobre *Cylindrocarpon destructans* el principal patógeno aislado en viñedos jóvenes con síntomas de Pie Negro. Evaluaron *in vitro* los efectos de 14 materias activas (Carpropamid, Cyprodinil, Pyrimethanil, Benomyl, Tebuconazol, Thiabendazol, Prochloraz, Difenconazol, Fosetyl-Al, Azoxystrobin, Trifloxystrobin, Tolyfluanid, Cypronidil + Fluxidioxonil, Carbendazima + Flusilazol) sobre el crecimiento de micelio y la germinación de las esporas de 4 aislados de *Cylindrocarpon destructans*. Las materias activas que mostraron mayor efecto inhibitor sobre el crecimiento del micelio, en orden decreciente, fueron: Prochloraz, Carbendazima + Flusilazol, Benomilo, Cypronidil +

Fludioxonil y Tebuconazol; y sobre la germinación de las esporas de *Cylindrocarpon destructans*: Cypronidil + Fludioxonil, Tolyfluanid, Azoxystrobin y Trifloxystrobin.

Uno de los problemas que plantea el tratamiento frente a los hongos de la madera es la dificultad de hacer llegar el tratamiento directamente a los tejidos afectados. Para favorecer la aplicación intravascular del fungicida en los últimos años se han realizado diversas investigaciones basadas en la aplicación de distintos fungicidas mediante inyección directa al tronco.

Calzarano y col. (2004) en un estudio llevado a cabo en tres parcelas localizadas en las provincias de Teramo y Abruzzi (Italia), severamente afectadas por yesca, inyectaron directamente al tronco o en la tierra distintos fungicidas (triazoles y Fosetyl Al), después de haber sometido a las plantas enfermas a una renovación del tronco. Los cortes de las partes enfermas del tronco permitieron determinar el grado y el tipo de deterioro de la madera. El tratamiento del fungicida comenzó en 1995, cuando se realizó la renovación del tronco y continuó hasta 1998, las vides fueron supervisadas durante cuatro años más, hasta 2002. De manera general, el método de inyección en el tronco dio mejores resultados que la inyección en tierra.

En Hungría, Dula y col., (2007), ensayaron la inyección en el tronco de varios fungicidas (Propiconazol, Difenconazol, Thiabendazol, Propinoconazol + Thiabendazol) antes del comienzo del reflujo de savia en el xilema, en varias parcelas afectadas de Yesca, en el año 2005. Se observó tanto si disminuían los síntomas de Yesca como si aumentaba el vigor de las plantas, resultando que el número de plantas con síntomas de Yesca decreció y las distintas materias activas no influyeron en el vigor de las plantas.

Darrieutort y Lecomte (2007) evaluaron las técnicas de inyección de fungicidas en el control de las enfermedades de la madera de la vid. Las inyecciones se realizaron con el inyector StemJect<sup>®</sup>. Se realizaron de 2 a 4 orificios de 8mm de diámetro con una profundidad del 80% del diámetro del tronco de la cepa. Se probó la eficacia de tres materias activas: dos fungicidas derivados del Triazol (Propiconazol y Difenconazol) y un elicitor (Ácido 2-Hidroxybenzoico). Durante los años siguientes al tratamiento (2001-2005) dos variedades susceptibles manifestaron síntomas: Cabernet Sauvignon y Cabernet Franc. Las plantas no tratadas también desarrollaron síntomas de Yesca o Eutipiosis, y los fungicidas derivados del Triazol tuvieron efectos fitotóxicos.

La técnica de la inyección del fungicida en el tronco tiene un futuro prometedor pero hasta el momento las materias activas ensayadas no han proporcionado un control

definitivo de las enfermedades de la madera aunque, como se ha mencionado anteriormente, en algunos casos se ha conseguido reducir el grado de afectación de las plantas tratadas.

El objetivo del presente capítulo fue ensayar el efecto de un fungicida comercial, y sus dos materias activas, frente a los hongos asociados a las enfermedades de la madera de la vid. El fungicida comercial Escudo<sup>®</sup> y sus materias activas Flusilazol y Carbendazima se ensayaron frente a 14 especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid, midiendo su efecto tanto en placa Petri como en sarmientos de vid.

## Materiales y métodos

### 1. Ensayo de la actividad del fungicida comercial Escudo® y sus materias activas Carbendazima y Flusilazol.

El fungicida Escudo® (DuPont, Agricultural products, Barcelona, España) está compuesto por dos materias activas: Carbendazima (10g/l) y Flusilazol (5g/l). Son dos moléculas con actividad fungicida sistémica, un silicotriazol y un bencimidazol. Se presenta en forma de suspenso-emulsión, de aspecto viscoso y coloración azul turquesa. Ha sido diseñado para su uso como fungicida protector de las heridas de poda frente a los ataques de las enfermedades de la madera, ofreciendo una doble protección, actuando a la vez de barrera física y química. Para el estudio de la actividad de cada una de las materias activas se utilizaron Carbendazima 1% (Probelte) y Flusilazol 0,5% (Nustar, DuPont).

El ensayo se realizó, tanto en placa Petri como en sarmientos, frente a 14 especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid (Tabla 2, capítulo I Materiales y métodos).

#### 1.1. Actividad fungicida en placa Petri

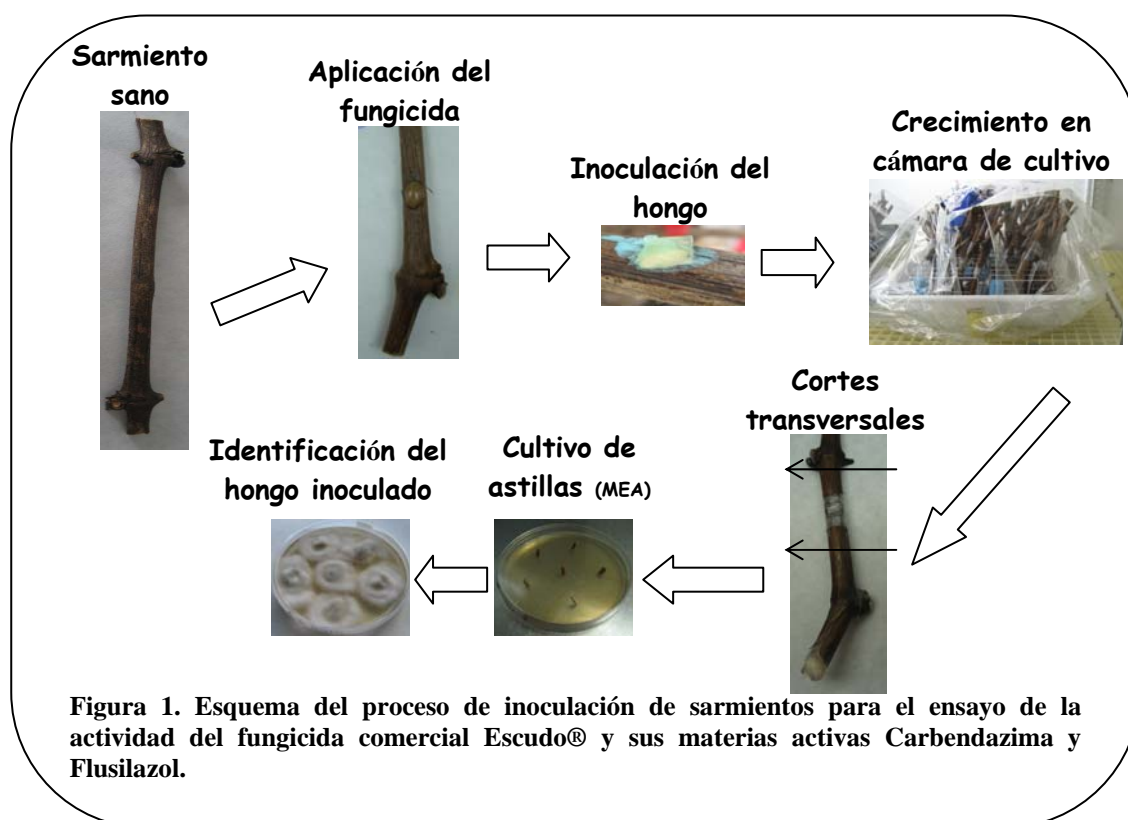
El ensayo se realizó en medio de cultivo MEA suplementado con cloranfenicol. El fungicida Escudo® se utilizó al 50% para facilitar su homogeneización sobre el medio de cultivo MEA. Carbendazima y Flusilazol se utilizaron en la concentración a la que se encuentran en Escudo® (Carbendazima 1% y Flusilazol 0,5%).

Se sembraron 5 placas Petri para cada uno de las 14 especies de hongos en las que previamente se habían extendido 150 µl del fungicida sobre 1/3 de la placa, en el centro de los 2/3 restantes se sembró la especie correspondiente. Como control de crecimiento del hongo se sembraron 5 placas sin fungicida para cada una de las especies ensayadas. Las placas se incubaron en estufa a 25° C y se midió el crecimiento del hongo durante 20 días. Para el análisis de los resultados se consideró el crecimiento de la placa control como 100% y se calculó el porcentaje de crecimiento del hongo en presencia de cada uno de los fungicidas, como porcentaje de crecimiento respecto del control.

Las especies que no fueron capaces de crecer en presencia de fungicida fueron resembradas en nuevas placas de PDA sin fungicida para determinar la capacidad fungicida o fungiestática del mismo.

### 1.2. Actividad fungicida en sarmientos

Se utilizaron sarmientos procedentes de la poda de cepas de la variedad Tempranillo. Los sarmientos fueron cortados en fragmentos de 15-20 cm dejando dos nudos por fragmento, se lavaron superficialmente con agua y jabón, se dejaron secar y se esterilizaron en autoclave durante 40 minutos a 121° C. Se realizó una herida entre los nudos de cada sarmiento en la que se aplicó 50 µl del fungicida correspondiente, se dejó secar, se añadió un fragmento de agar del hongo y se selló la herida con Parafilm®. Para cada una de las especies y fungicidas ensayados se realizaron 10 réplicas. En los sarmientos control no se añadió fungicida, tan sólo el trozo de agar con micelio de la especie a ensayar. Los sarmientos inoculados se mantuvieron en cámara de cultivo a 22° C durante 14 horas de luz y a 18° C durante 10 horas de oscuridad. El tiempo de permanencia en la cámara de cultivo fue variable dependiendo del tipo de hongo inoculado. Transcurrido ese tiempo los sarmientos fueron analizados 1 cm por encima y por debajo de la herida. Para ello se sembraron 3 astillas por corte en placas con medio MEA que fueron incubadas a 25° C para determinar el crecimiento o no de la especie ensayada (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema del proceso de inoculación de sarmientos para el ensayo de la actividad del fungicida comercial Escudo® y sus materias activas Carbendazima y Flusilazol.

## 2. Análisis estadístico

Todos los análisis realizados fueron llevados a cabo con el programa SAS 9.1 con ayuda del personal de la Facultad de Matemáticas de la Universidad de Valladolid.

### 2.1. análisis de datos de los ensayos en placa

Los resultados de los ensayos *in vitro* fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA). El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. Las distribuciones estadísticas más comunes son la lambda ( $\Lambda$ ) de Samuel Stanley Wilks, la traza de Pillai-M. S. Bartlett, la traza de Lawley-Hotelling y la raíz mayor de Roy. La mejor aproximación de la lambda de Wilkins fue hallada por C. R. Rao. En una primera aproximación se utilizó el F-estadístico razón de verosimilitud Lambda de Wilks para contrastar si las medias entre los grupos son iguales ( $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ ), este valor se comparó con una distribución F, para obtener el p-valor. Posteriormente se realizó una comparación de las componentes medias de cada variable con la variable control (ANOVA), y mediante un t-estadístico con aproximación de Bonferroni evaluamos los intervalos.

### 2.2. análisis de datos de los ensayos en placa

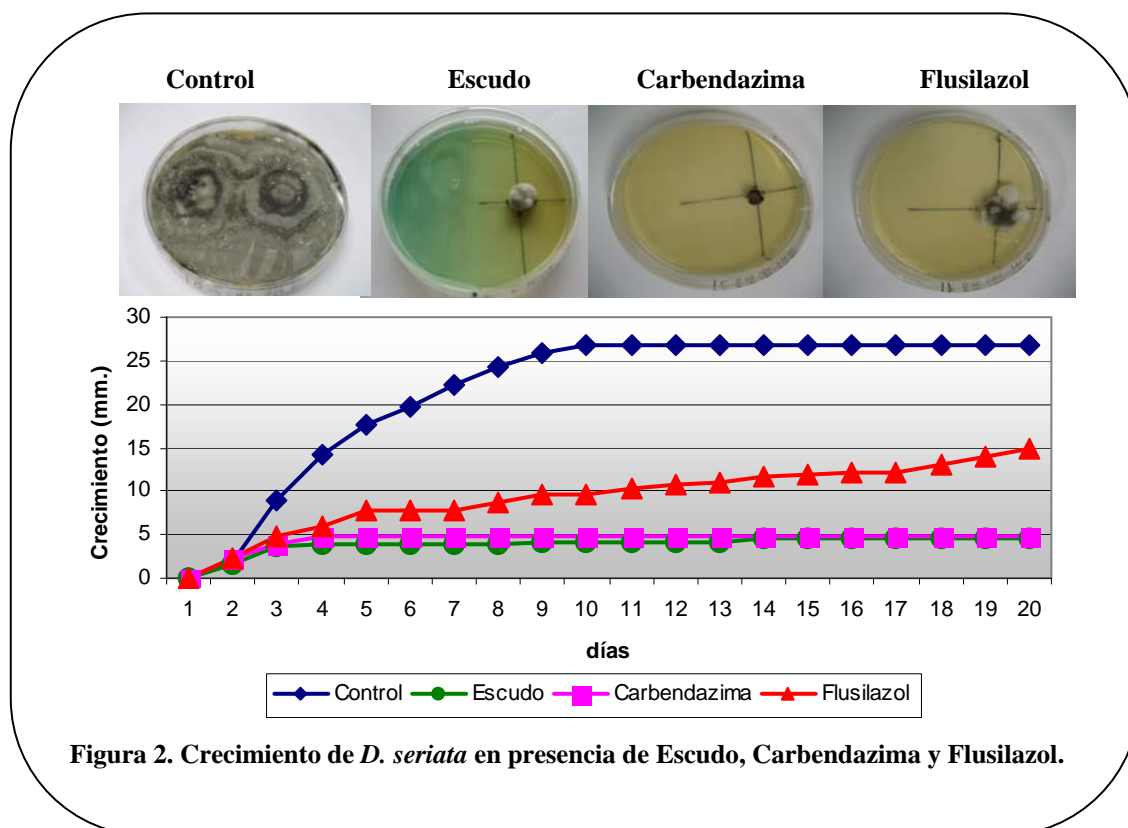
Se estudió la relación existente entre la aplicación de un fungicida (Escudo<sup>®</sup>, Carbendazima o Flusilazol) y el crecimiento de un hongo (con cada uno de las 14 especies de hongos ensayados), siendo éstas variables categóricas.

Para el estudio se emplea una tabla de contingencia para registrar y analizar la relación entre las dos variables: crecimiento o no crecimiento del hongo frente a la utilización o no utilización de fungicida. Se realiza un muestreo retrospectivo ya que están fijadas de antemano las filas (10 individuos para cada fila), por lo que la tabla sigue una distribución multinomial producto. Para probar la independencia de las muestras entre sí se utilizó el test Chi-cuadrado de Pearson en el que la hipótesis nula fué la no asociación entre las variables con un nivel de confianza del 95%.

## Resultados

### 1. Efectividad del fungicida comercial Escudo® y sus materias activas Carbendazima y Flusilazol en placa.

El crecimiento de cada una de las especies en las placas control fue considerado como un crecimiento del 100%, de esta forma el crecimiento de cada una de las especies en presencia del fungicida se expresó como porcentaje de crecimiento respecto del control. La Figura 2 representa el crecimiento de *Diplodia seriata* en presencia de Escudo®, Carbendazima o Flusilazol, comparado con el crecimiento en las placas control. Puede observarse como en ausencia de fungicida *D. seriata* alcanza el máximo crecimiento a los 10 días, mientras que en presencia de Flusilazol tras 20 días no alcanza ni la mitad del radio de crecimiento que alcanza la placa control, y en presencia de Escudo® o Carbendazima tan sólo crece durante los 4 primeros días, observándose a continuación una inhibición del crecimiento.



Las gráficas correspondientes al resto de las especies ensayadas, así como los datos estadísticos se recogen en un anexo al final de este capítulo (Anexo Capítulo IV).

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos para todas las especies estudiadas:

Especie	Control	Escudo®	Carbendazima	Flusilazol
<i>D. seriata</i>	26,9 ± 0,4	4,5 ± 1	4,7 ± 0,8	14,9 ± 2,6
<i>D. mutila</i>	24,6 ± 1,9	1,2 ± 0,9	2,7 ± 0,6	5,1 ± 2,3
<i>B. dothidea</i>	26,7 ± 0,4	3,9 ± 0,5	4,6 ± 0,7	14 ± 0,7
<i>N. parvum</i>	26,9 ± 0,9	3,4 ± 0,6	4,5 ± 0,7	6,4 ± 0,9
<i>Do. sarmentorum</i>	26,2 ± 0,7	0	0 <sup>F</sup>	0
<i>Do. iberica</i>	26,7 ± 1	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,4	11,1 ± 0,5
<i>Do. viticola</i>	26,4 ± 0,6	2,7 ± 0,5	1,6 ± 0,4	3,1 ± 1,2
<i>P. chlamydospora</i>	12 ± 0,9	0	0	0
<i>P. aleophilum</i>	14,4 ± 0,3	0,3 ± 0,4	0,9 ± 0,4	10,6 ± 0,9
<i>C. destructans</i>	23,5 ± 1,7	4,1 ± 1,4	12,3 ± 1,5	8,8 ± 1,2
<i>S. hirsutum</i>	27,8 ± 3,3	34,9 ± 1,4	36,5 ± 0,4	33,3 ± 1,7
<i>F. mediterranea</i>	26,6 ± 0,1	10,1 ± 2,7	31,3 ± 0,9	12,5 ± 1,7
<i>P. viticola</i>	13,4 ± 6,8	0	0 <sup>F</sup>	0
<i>E. lata</i>	20,7 ± 0,4	0	1,2 ± 1,7	0 <sup>F</sup>

**Tabla 1. Porcentaje de crecimiento *in vitro* de cada una de las especies ensayadas en ausencia (control) y presencia de fungicida.** <sup>F</sup> materias activas que presentaron efecto fungicida.

El fungicida comercial Escudo® inhibe de forma significativa ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de todas las especies de ascomicetos ensayadas (con valores del 0-20%), pero permite el crecimiento al 40% de *F. mediterranea* y no ejerce ningún efecto sobre *S. hirsutum* (crecimiento del 100%). La inhibición del crecimiento fue total en el caso de *E. lata*, *P. chlamydospora*, *Do. sarmentorum* y *P. viticola*.

Carbendazima inhibe significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de todas las especies ensayadas excepto de *C. destructans* que presentó un crecimiento del 50%, y los basidiomicetos *F. mediterranea* y *S. hirsutum* cuyo crecimiento no se vio afectado (100%). La inhibición de *P. chlamydospora*, *Do. sarmentorum* y *P. viticola* fue completa.

Flusilazol inhibe totalmente el crecimiento de *E. lata*, *P. chlamydospora*, *Do. sarmentorum* y *P. viticola*; redujo en un 80-90% el crecimiento de *N. parvum*, *Do.*

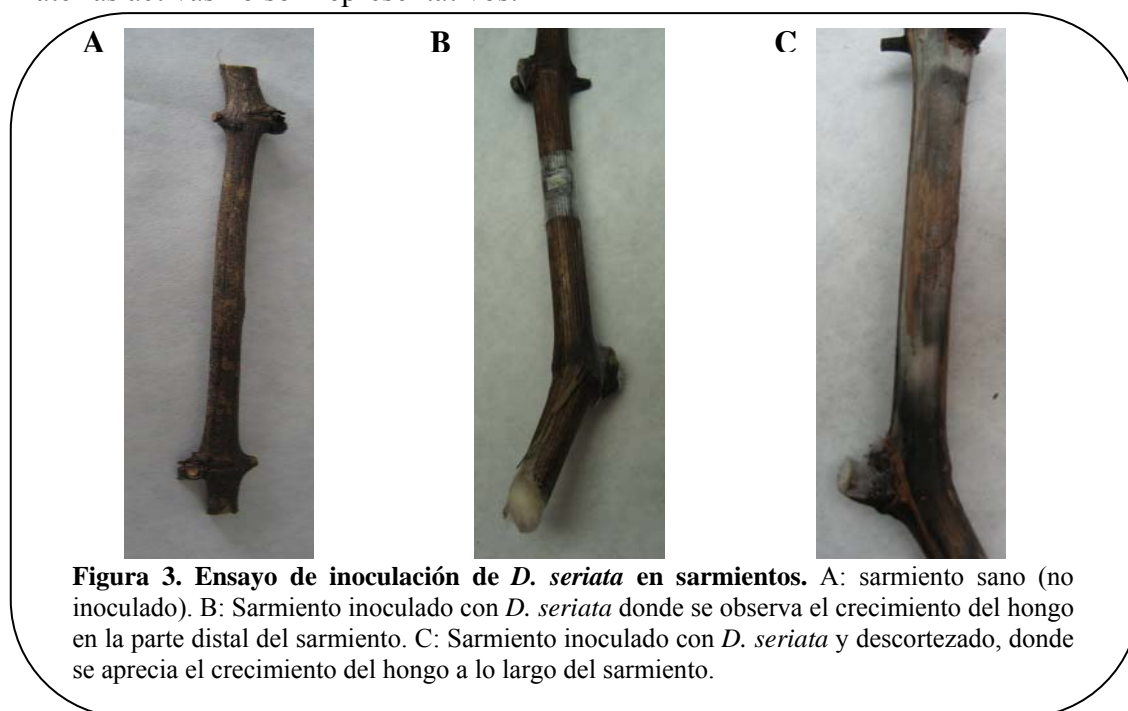


*viticola* y *D. mutila*; *F. mediterranea*, *B. dothidea*, *D. seriata*, *C. destructans* y *Do. iberica* presentaron crecimientos del 40-60%; *P. aleophilum* creció en torno al 80% respecto del control, mientras que el crecimiento de *S. hirsutum* fue similar al del control (100%).

En cuanto a la actividad fungicida o fungistática de cada una de las materias activas ensayadas: Carbendazima tuvo un efecto fungicida frente a *Do. sarmentorum* y *P. viticola*, mientras que se comportó como fungistático frente a *P. chlamydospora*; Flusilazol resultó tener capacidad fungicida frente a *E. lata* y fungistática frente a *P. chlamydospora*, *Do. sarmentorum* y *P. viticola*; Escudo<sup>®</sup> tuvo un efecto fungistático frente a *Do. sarmentorum*, *P. chlamydospora*, *P. viticola* y *E. lata*, puesto que el merecimiento de los aislados se recuperó al pasarlos a medio de cultivo fresco (sin fungicidas).

## 2. Efectividad del fungicida comercial Escudo<sup>®</sup> y sus materias activas Carbendazima y Flusilazol en sarmientos de vid.

De las 14 especies de hongos inoculadas en sarmientos tan sólo se obtuvo un porcentaje del 100% de crecimiento en los sarmientos control inoculados con *D. seriata*, *D. mutila*, *B. dothidea*, *Do. iberica* y *Do. viticola*; *N. parvum* creció en el 90% de los sarmientos control; *S. hirsutum* y *E. lata* en el 80%; *P. aleophilum* en el 50% y *C. destructans* en el 20%. Para el resto de las especies ensayadas o no hubo crecimiento en los sarmientos control o se contaminaron por lo que los datos obtenidos con las distintas materias activas no son representativos.



El porcentaje de sarmientos crecidos para cada una de las especies ensayadas se resume en la siguiente tabla:

Especie	Control	Escudo <sup>®</sup>	Carbendazima	Flusilazol
<i>D. seriata</i>	100	10	10	20
<i>D. mutila</i>	100	0	0	0
<i>B. dothidea</i>	100	10	10	30
<i>N. parvum</i>	90	0	0	0
<i>Do. iberica</i>	100	10	0	0
<i>Do. viticola</i>	100	10	40	70
<i>P. aleophilum</i>	50	0	0	0
<i>C. destructans</i>	20	0	0	0
<i>S. hirsutum</i>	80	0	100	0
<i>E. lata</i>	80	0	0	0

**Tabla 2. Porcentaje de crecimiento en sarmiento de cada una de las especies ensayadas en ausencia (control) y presencia de fungicida.**

Debido a que el porcentaje de crecimiento en los sarmientos control de *C. destructans* fue tan sólo del 20%, a pesar de no crecer en presencia de ninguna de las tres sustancias ensayadas, no se puede demostrar la efectividad de ninguno de los tratamientos ( $\chi^2 > 0,05$ ).

*P. aleophilum* creció en el 50% de los sarmientos control, mientras que no creció en ninguno de los sarmientos inoculados, por lo que Escudo<sup>®</sup>, Carbendazima y Flusilazol ejercen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de esta especie ( $\chi^2 < 0,05$ ).

En ausencia de fungicidas *E. lata*, *N. parvum*, *D. mutila*, *Do. iberica*, *D. seriata* y *B. dothidea* crecieron en el 80-100% de los sarmientos. Las diferencias de crecimiento en los sarmientos control y en los sarmientos tratados con fungicida fueron significativas ( $\chi^2 < 0,05$ ), por lo que las tres sustancias ensayadas ejercieron un efecto inhibitorio frente a estas especies.

La diferencia de crecimiento de *Do. viticola* en ausencia y presencia de Escudo<sup>®</sup> o Carbendazima mostró un efecto significativamente inhibitorio ( $\chi^2 < 0,05$ ), que no se puso de manifiesto en los sarmientos tratados con Flusilazol ( $\chi^2 > 0,05$ ). En presencia de

Carbendazima *Do. viticola* creció en el 40% de los sarmientos. En el tratamiento con Escudo® se observa un efecto sinérgico de ambas materias activas, ya que se observó mayor inhibición de la mezcla (crecimiento del 10%) que la observada en los sarmientos inoculados con Carbendazima (40%) y Flusilazol (70%).

No se observó ningún efecto de Carbendazima sobre el crecimiento de *S. hirsutum* ( $\chi^2 > 0,05$ ), mientras que Flusilazol ejerció un efecto inhibitorio, impidiendo el crecimiento tanto en los sarmientos tratados con Escudo® como los tratados sólo con Flusilazol.

## Discusión

En el presente capítulo se estudió el efecto fungicida de un formulado comercial y sus materias activas, sobre 14 especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid. El trabajo se realizó sobre medio de cultivo MEA en placa Petri y en sarmientos de vid. Los resultados presentados, en general confirman y completan los resultados obtenidos con anterioridad en el grupo de hongos de la vid del departamento de Viticultura del ITACYL (Martín y Cobos, 2007b).

En el ensayo realizado en placa Petri, la mayoría de los hongos estudiados (Ascomicetos) son más sensibles a Carbendazima que a Flusilazol. Los crecimientos de las dos especies estudiadas pertenecientes al *Phyla* Basidiomicetos, *Stereum hirsutum* y *Fomitiporia mediterranea* no se ven afectadas por Carbendazima y son parcialmente inhibidos por Flusilazol. Se confirma que en presencia de Escudo<sup>®</sup> (fungicida comercial cuyas materias activas son Carbendazima y Flusilazol) el crecimiento de los hongos asociados a los decaimientos de la vid excepto *Stereum hirsutum* se reduce como mínimo a la mitad. Jaspers (2001) en su estudio precisa que Carbendazima y Flusilazol actúan más sobre la inhibición del crecimiento de micelio que sobre la germinación de las esporas de *Phaeomoniella chlamydospora*. Carbendazima y Flusilazol también son efectivos contra *Cylindrocarpon destructans* (Rego y col., 2006), en nuestros ensayos en placa se observa un efecto sinérgico ya que cada fungicida inhibe el crecimiento en un 50% y un 60% respectivamente y en presencia de Escudo<sup>®</sup> la inhibición es de un 85%. En los estudios que se realizaron sobre *Eutypa lata* CBS 101.932 se observó una inhibición parcial del crecimiento en presencia de Escudo<sup>®</sup> (Martín y Cobos, 2007b) sin embargo con el aislado *Eutypa lata* ST 309 la inhibición es completa. Esto indicaría que hay variación de respuesta entre unos aislados y otros frente a un fungicida como también hay diferencias en la severidad de los síntomas que producen unos aislados y otros (Péros & Berger, 1994).

Al igual que en placa Petri, en los ensayos realizados sobre sarmiento, Carbendazima tiene mayor efecto inhibitor sobre el crecimiento de la mayoría de las especies estudiadas. Los resultados son comparables para *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, y *Eutypa lata*. En la inoculación de sarmientos con *Phaeoacremonium aleophilum* y *Cylindrocarpon destructans* en ausencia de fungicida, el crecimiento ha sido del 50% y del 20%

respectivamente, valores que limitan la evaluación de los efectos de los fungicidas sobre el crecimiento de dichas especies inoculadas en sarmientos. *Phaeomoniella chlamydospora*, *Dothiorella sarmentorum* y *Fomitiporia mediterranea*, no crecieron en los sarmientos control (en ausencia de fungicidas) y con el tiempo acabaron contaminándose con *Penicillium* y otros hongos. En estas tres especies por tanto, el estudio con fungicidas no es representativo. Sin embargo, ensayos de inoculación de sarmientos con otros aislados de *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* realizados por Sparapano y col., (2000a y b) producen un oscurecimiento de la madera similar a los síntomas de podredumbre que se observan en la madera de las plantas con síntomas de Yesca. En cuanto a *Dothiorella iberica* y *Dothiorella viticola*, los resultados obtenidos en ensayos en placa Petri y en sarmientos se contradicen. En medio de cultivo *Dothiorella iberica* creció menos en presencia de Flusilazol que en presencia de Carbendazima. En sarmientos en presencia de Carbendazima o de Flusilazol el hongo no se desarrolla y en presencia de Escudo® se aisló el hongo en uno de los diez sarmientos. En medio de cultivo *Dothiorella viticola* se desarrolla de igual modo en presencia de los tres fungicidas (10%), sin embargo en sarmientos el hongo se desarrolló en un 70% en presencia de Flusilazol, en un 40% en presencia de Carbendazima y en un 10% en presencia de Escudo®.

La interacción entre hongo y huésped puede tener distintos efectos para la planta: si se beneficia se habla de mutualismo, si el resultado es neutro se habla de comensalismo y si se perjudica se habla de parasitismo y/o patogenismo (Trapero, 2000); pero no existe un consenso en la terminología que se aplica a las relaciones entre hongo y huésped ya que estas difieren pudiendo pasar de mutualismo a patogenismo en función de los aislados, de las variedades, de las condiciones ambientales y nutritivas, en definitiva de los estados fisiológicos de cada agente implicado en la interacción. Algo así se estaría observando con los comportamientos de *Dothiorella iberica* y *Dothiorella viticola* cuyas respuestas a Carbendazima y Flusilazol varía en función del medio nutritivo en el que se encuentran. Finalmente *Stereum hirsutum*, tanto en sarmientos como en placa Petri, se desarrolla ligeramente más en presencia de Carbendazima que en el control positivo, por lo que se corrobora el hecho de que el hongo sea capaz de alimentarse de los compuestos de Carbendazima. Sin embargo, en presencia de Escudo® o de Flusilazol el hongo no se desarrolla sobre los sarmientos; Flusilazol en contacto directo con *Stereum hirsutum* es capaz de inhibir su desarrollo.

En medio de cultivo MEA, Escudo<sup>®</sup> sólo inhibe al 100% el crecimiento de *Phaeomoniella chlamydospora*, *Dothiorella sarmentorum*, *Eutypa lata* y *Phomopsis viticola* de lo que se deduce que el efecto de Carbendazima y Flusilazol sobre las otras diez especies analizadas es fungicida. Para ampliar la información sobre el efecto inhibidor de Carbendazima y Flusilazol, las siembras de las cuatro especies que no crecieron se trasladaron a un medio exento de inhibidor. Se observó que Flusilazol tiene efecto fungicida sobre *Eutypa lata* y fungicida sobre *Phaeomoniella chlamydospora*, *Dothiorella sarmentorum* y *Phomopsis viticola* y que Carbendazima actúa como fungicida sobre *Dothiorella sarmentorum* y *Phomopsis viticola* y como fungicida sobre *Phaeomoniella chlamydospora* y *Eutypa lata*.

El impulso de la agricultura ecológica y la creciente preocupación por la acumulación de sustancias químicas, tanto en los suelos como en los productos de consumo humano, ha provocado un creciente interés por el estudio de materias activas de origen natural así como al uso de microorganismos que antagonicen a los distintos patógenos que atacan a las plantas, sin interferir en la calidad y sanidad final del producto. En la actualidad se está generalizado el uso de agentes de biocontrol como método de control de enfermedades. Existe una enorme diversidad de organismos (virus, bacterias, protozoos y nematodos) empleados como agentes de biocontrol, siendo los micofungicidas (hongo frente a hongo) los más utilizados. Dentro de éstos, más de la mitad pertenecen al grupo de los hifomicetos, y de ellos la gran mayoría forman parte del género *Trichoderma* (Papavizas, 1985). Un ejemplo es el uso de distintas cepas de *Trichoderma harzianum*, como agente de control frente a *Botrytis cinerea* (O'Neill y col., 1996), o frente a hongos fitopatógenos del suelo (Grondona y col., 1997). Sin duda, y debido a la progresiva prohibición de las distintas materias activas capaces de hacer frente a los hongos asociados a las enfermedades de la madera, se hace necesario recurrir al estudio de agentes de biocontrol que posibiliten hacer frente a este problema sin interferir en el medio ambiente, ni en la calidad final de las uvas.

## Anexo Capítulo IV

### Gráficos y tablas





## Datos correspondientes a los ensayos presentados en el Capítulo IV

Para facilitar la comprensión de los ensayos presentados en el capítulo IV, a continuación se recogen los datos obtenidos en cada uno de los ensayos. Estos datos fueron resumidos en las tablas 1 y 2, y se creyó conveniente no incluirlos en la redacción del capítulo, para facilitar su lectura.

### 1. Ensayo de la actividad fungicida de Escudo<sup>®</sup>, Carbendazima y Flusilazol frente a hongos asociados a los decaimientos de la vid.

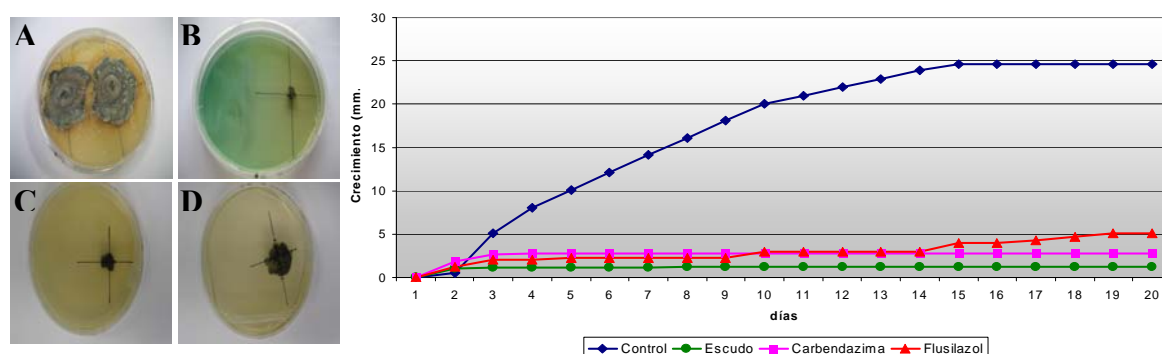


Figura 1. Crecimiento de *D. mutila* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo<sup>®</sup> (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

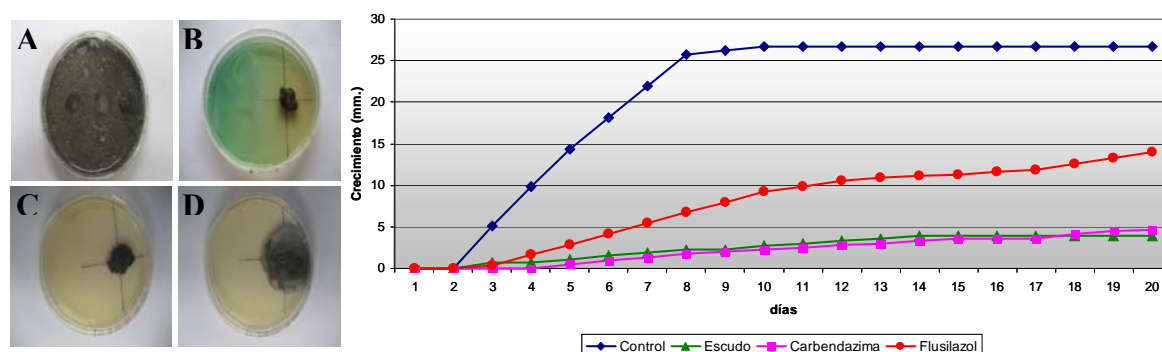


Figura 2. Crecimiento de *B. dothidea* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo<sup>®</sup> (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

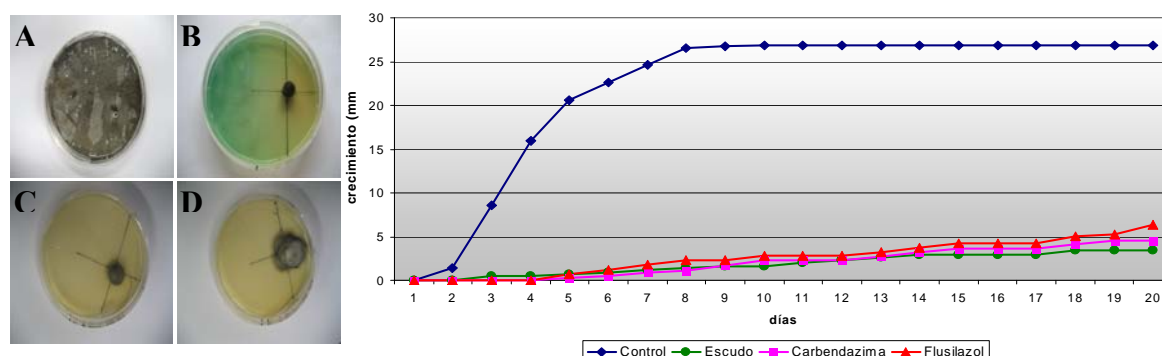


Figura 3. Crecimiento de *N. parvum* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo<sup>®</sup> (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

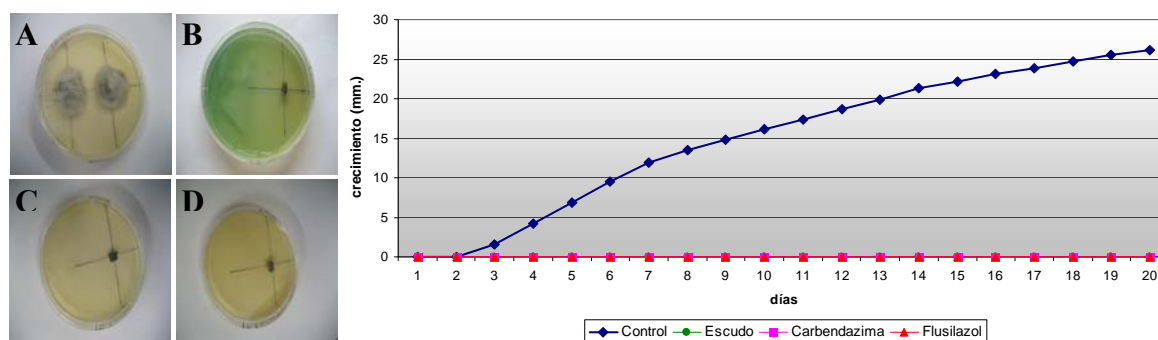


Figura 4. Crecimiento de *Do. sarmentorum* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo® (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

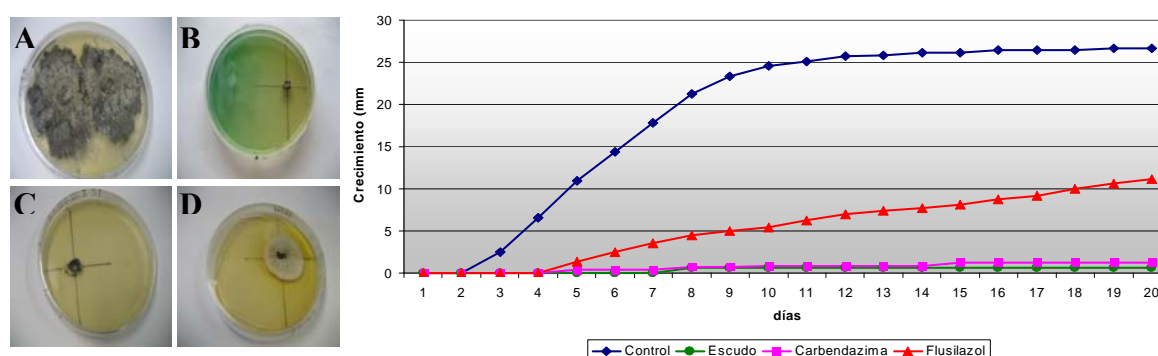


Figura 5. Crecimiento de *Do. iberica* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo® (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

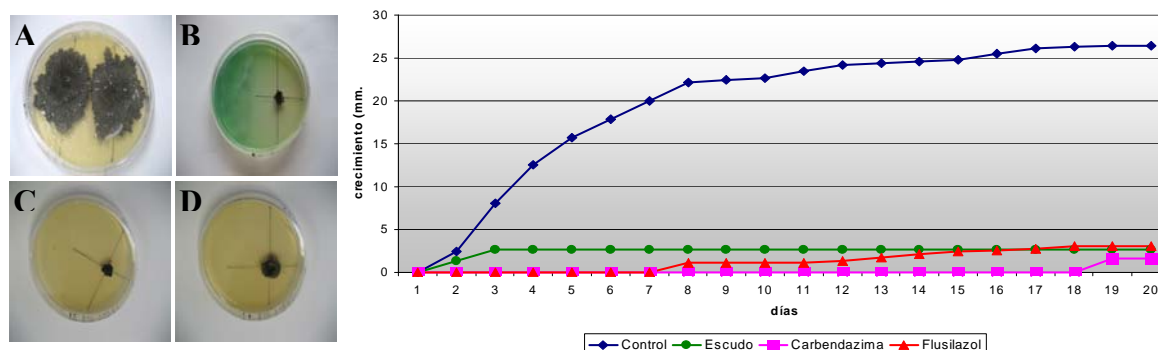


Figura 6. Crecimiento de *Do. viticola* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo® (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

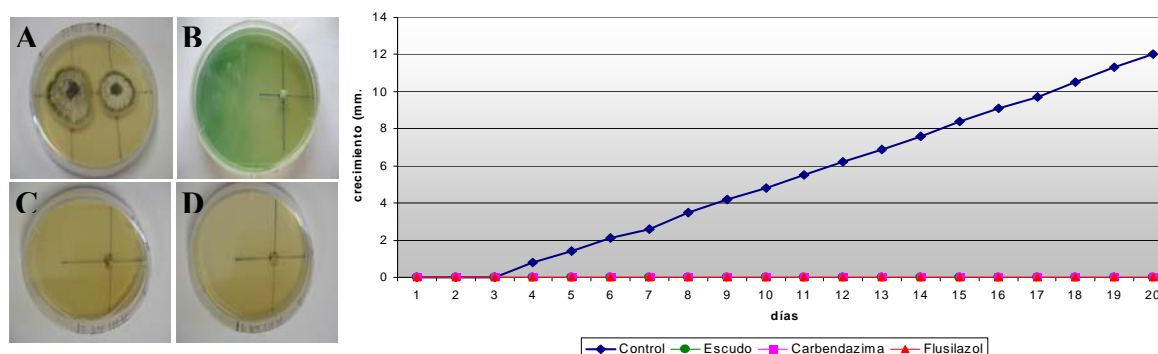


Figura 7. Crecimiento de *P. chlamydospora* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo® (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

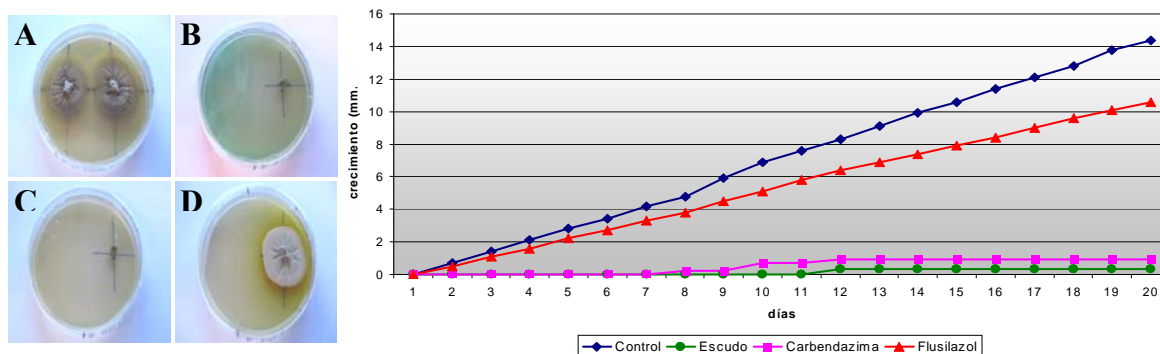


Figura 8. Crecimiento de *P. aleophilum* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo® (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

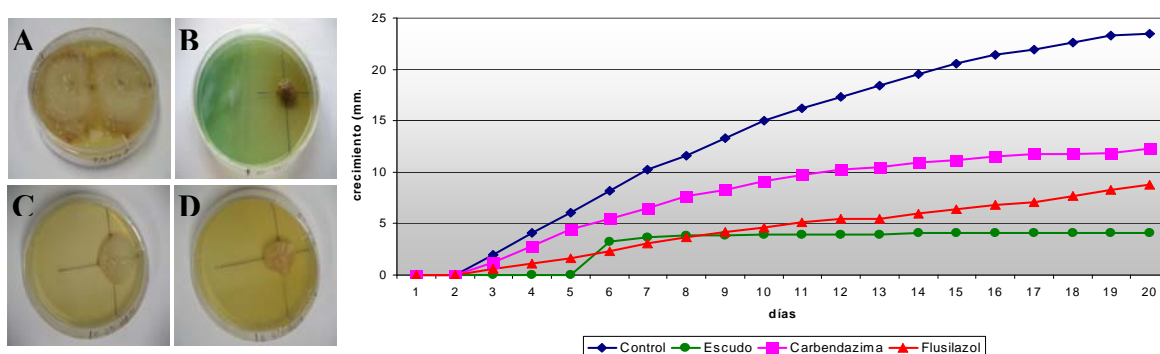


Figura 9. Crecimiento de *C. destructans* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo® (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

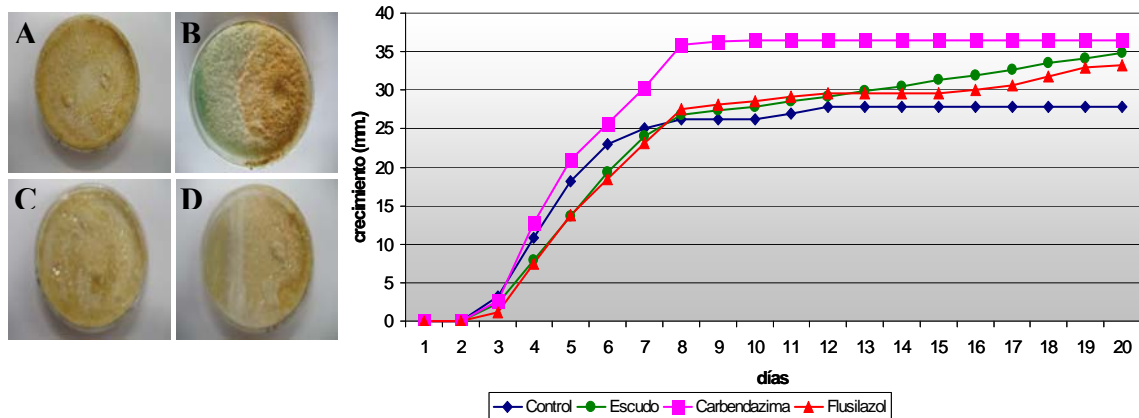


Figura 10. Crecimiento de *S. hirsutum* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo® (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

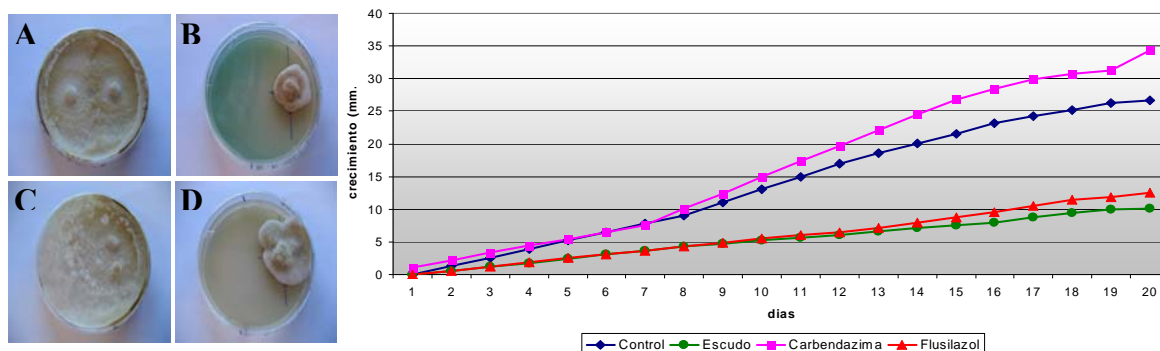


Figura 11. Crecimiento de *F. mediterranea* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo® (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

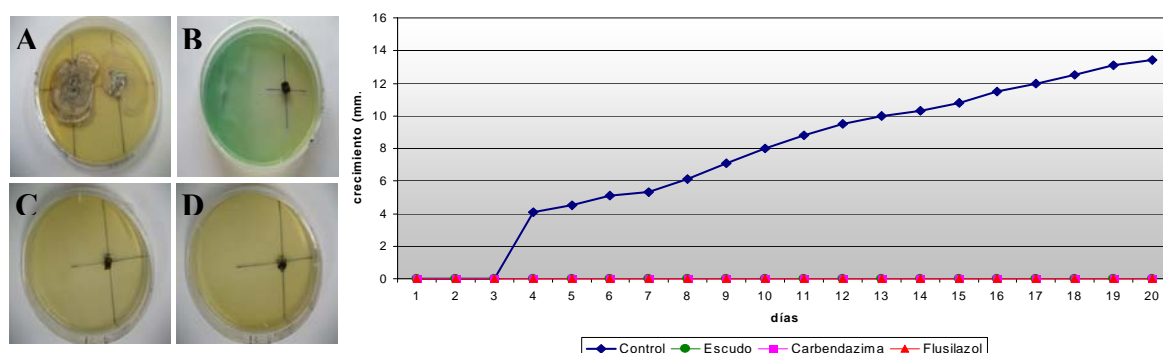


Figura 12. Crecimiento de *P. viticola* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo<sup>®</sup> (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

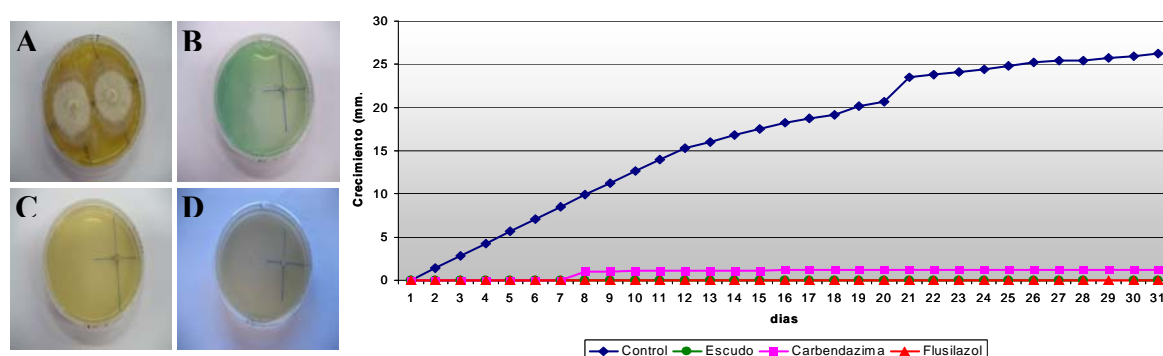


Figura 13. Crecimiento de *E. lata* en ausencia de fungicida (control, A), en presencia de Escudo<sup>®</sup> (B), Carbendazima (C) y Flusilazol (D).

## 2. Análisis estadístico

### 2.1. Evaluación del efecto fungicida en placa Petri

A continuación se recogen los datos obtenidos para los distintos estadísticos analizados así como una tabla con los resultados del Test T de Bonferroni (Dunn) en presencia de Escudo<sup>®</sup>, Carbendazima y Flusilazol. El valor crítico de F con un nivel de confianza del 0,05 y grados de libertad ( $r-1=3$ ;  $N-r=76$ ) según la tabla de distribución F de Sneedecor se encuentra entre 2,72-2,76. Las comparaciones significativas a un nivel de confianza del 0,05 se representan por asteriscos (\*\*\*)

#### 2.1.1. Resultados obtenidos para *D. seriata*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,30183726	58,60	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,69816274	58,60	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	2,31304361	58,60	3	76	<0,0001

Roy's Greatest Root	2,31304361	58,60	3	76	<0,0001
---------------------	------------	-------	---	----	---------

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	17,640	13,525	21,755	***
Carbendazima	17,210	13,095	21,325	***
Flusilazol	12,210	8,095	16,325	***

### 2.1.2. Resultados obtenidos para *D. mutila*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,29162504	61,54	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,70837496	61,54	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	2,42906079	61,54	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	2,42906079	61,54	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	15,970	12,311	19,629	***
Carbendazima	14,560	10,901	18,219	***
Flusilazol	14,180	10,521	17,839	***

### 2.1.3. Resultados obtenidos para *B. dothidea*

Estadístico	Valor	F-Valor	NumDF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.33043823	51,33	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0.66956177	51,33	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	2.02628419	51,33	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	2.02628419	51,33	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	18,240	13,600	22,880	***

Carbendazima	18,540	13,900	23,180	***
Flusilazol	12,965	8,325	17,605	***

#### 2.1.4. Resultados obtenidos para *N. parvum*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,20957872	95,54	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,79042128	95,54	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	3,77147683	95,54	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	3,77147683	95,54	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	20,300	16,385	24,215	***
Carbendazima	20,095	16,180	24,010	***
Flusilazol	19,505	15,590	23,420	***

#### 2.1.5. Resultados obtenidos para *Do. sarmentorum*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,30056711	58,95	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,69943289	58,95	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	2,32704398	58,95	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	2,32704398	58,95	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	15,075	11,314	18,836	***
Carbendazima	15,075	11,314	18,836	***
Flusilazol	15,075	11,314	18,836	***

**2.1.6. Resultados obtenidos para *Do. iberica***

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,30960277	56,49	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,69039723	56,49	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	2,22994529	56,49	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	2,22994529	56,49	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	18,765	14,279	23,251	***
Carbendazima	18,465	13,979	22,951	***
Flusilazol	13,740	9,254	18,226	***

**2.1.7. Resultados obtenidos para *Do. viticola***

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,19638856	103,66	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,80361144	103,66	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	4,09194636	103,66	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	4,09194636	103,66	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	17,315	13,819	20,811	***
Carbendazima	19,650	16,154	23,146	***
Flusilazol	18,480	14,984	21,976	***

**2.1.8. Resultados obtenidos para *P. chlamydospora***

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,41474464	35,75	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,58525536	35,75	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	1,41112219	35,75	3	76	<0,0001

Roy's Greatest Root	1,41112219	35,75	3	76	<0,0001
---------------------	------------	-------	---	----	---------

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	5,3300	3,6223	7,0377	***
Carbendazima	5,3300	3,6223	7,0377	***
Flusilazol	5,3300	3,6223	7,0377	***

### 2.1.9. Resultados obtenidos para *P. aleophilum*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,45625407	30,19	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,54374593	30,19	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	1,19176125	30,19	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	1,19176125	30,19	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	6,9750	4,5402	9,4098	***
Carbendazima	6,6150	4,1802	9,0498	***
Flusilazol	1,7650	-0,6698	4,1998	

### 2.1.10. Resultados obtenidos *C. destructans*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,55978661	19,92	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,44021339	19,92	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	0,78639500	19,92	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	0,78639500	19,92	3	76	<0,0001



Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	10,820	6,693	14,947	***
Carbendazima	5,895	1,768	10,022	***
Flusilazol	9,340	5,213	13,467	***

### 2.1.11. Resultados obtenidos para *S. hirsutum*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,95382935	1,23	3	76	0,3060
Pillai's Trace	0,04617065	1,23	3	76	0,3060
Hotelling-Lawley Trace	0,04840557	1,23	3	76	0,3060
Roy's Greatest Root	0,04840557	1,23	3	76	0,3060

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	-1,500	-11,575	8,575	
Carbendazima	-6,500	-16,575	3,575	
Flusilazol	-0,925	-11,000	9,150	

### 2.1.12. Resultados obtenidos para *F. mediterranea*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,69539866	11,10	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,30460134	11,10	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	0,43802405	11,10	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	0,43802405	11,10	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo®	8,570	2,047	15,093	***
Carbendazima	-2,775	-9,298	3,748	
Flusilazol	7,880	1,357	14,403	***

### 2.1.13. Resultados obtenidos para *P.viticola*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,29335544	61,02	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,70664456	61,02	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	2,40883404	61,02	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	2,40883404	61,02	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo <sup>®</sup>	7,6050	5,7401	9,4699	***
Carbendazima	7,6050	5,7401	9,4699	***
Flusilazol	7,6050	5,7401	9,4699	***

### 2.1.14. Resultados obtenidos para *E. lata*

Estadístico	Valor	F-Valor	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,28962118	62,14	3	76	<0,0001
Pillai's Trace	0,71037882	62,14	3	76	<0,0001
Hotelling-Lawley Trace	2,45278619	62,14	3	76	<0,0001
Roy's Greatest Root	2,45278619	62,14	3	76	<0,0001

Concentración	Diferencia entre medias	Límite inferior de confianza	Límite superior de confianza	Comparaciones significativas
Escudo <sup>®</sup>	12,020	9,153	14,887	***
Carbendazima	11,290	8,423	14,157	***
Flusilazol	12,020	9,153	14,887	***

## 2.2. Evaluación del efecto fungicida en sarmiento

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos en el análisis estadístico realizado mediante el test  $\chi^2$  (Chi-cuadrado). El valor crítico de  $\chi^2$  con 1 grado de libertad y un nivel de confianza del 0,05, es de 3,841. Siempre que el valor experimental de  $\chi^2$  sea mayor que el valor crítico, rechazaremos la hipótesis nula (no asociación entre variables), asumiendo que existe un efecto dependiente del tratamiento.

Especie	Crecimiento Control	Escudo®			Carbendazima			Flusilazol		
		crecimiento	$\chi^2$	p valor	crecimiento	$\chi^2$	p valor	crecimiento	$\chi^2$	p valor
<i>D. seriata</i>	10/10	1/10	16,36	<0,0001	1/10	16,36	<0,0001	2/10	13,33	0,0003
<i>D. mutila</i>	10/10	0/10	20	<0,0001	0/10	20	<0,0001	0/10	20	<0,0001
<i>B. dothidea</i>	10/10	1/10	16,36	<0,0001	1/10	16,36	<0,0001	3/10	10,76	0,0010
<i>N. parvum</i>	1/10	0/10	16,36	<0,0001	0/10	16,36	<0,0001	0/10	16,36	<0,0001
<i>Do. sarmentorum</i>	0/10	0/10			0/10			0/10		
<i>Do. iberica</i>	10/10	1/10	16,36	<0,0001	0/10	20	<0,0001	0/10	20	<0,0001
<i>Do. viticola</i>	10/10	1/10	16,36	<0,0001	4/10	8,57	0,0034	7/10	3,52	0,0603
<i>P. chlamydospora</i>	0/10	0/10			0/10			0/10		
<i>P. aleophilum</i>	5/10	0/10	6,66	0,0098	0/10	6,66	0,0098	0/10	6,66	0,0098
<i>C. destructans</i>	2/10	0/10	2,22	0,136	0/10	2,22	0,136	0/10	2,22	0,136
<i>S. hirsutum</i>	8/10	0/10	13,33	0,0003	10/10	2,22	0,136	0/10	13,33	0,0003
<i>F. mediterranea</i>	0/10	0/10			0/10			0/10		
<i>E. lata</i>	8/10	0/10	13,33	0,0003	0/10	13,33	0,0003	0/10	13,33	0,0003
<i>P. viticola</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd



## **Conclusiones**



1. Durante los últimos años se ha producido un aumento importante de la incidencia de Yesca y Eutipiosis en las distintas denominaciones de origen de Castilla y León.

2. Entre las especies que se han aislado con mayor frecuencia destacan, en orden decreciente *P. aleophilum*, *P. chlamydospora*, distintas especies de la familia *Botryosphaeriaceae* (principalmente *D. seriata*, *D. mutila*, *N. parvum* y *B. dothidea*), *Cylindrocarpon spp.* (*N. macrodidymum*, *C. liriodendri* y *C. olidum*), *F. mediterranea*, *P. viticola*, *E. lata* y *S. hirsutum*.

3. Relacionando los datos obtenidos en campo con los hongos aislados de las muestras recogidas en las distintas DD.OO de Castilla y León, no es posible establecer relaciones claras entre sintomatología y hongos asociados.

4. Se ha evidenciado la necesidad de buscar nuevos cebadores específicos que permitan detectar todos los aislados de *E. lata*, así como las distintas especies del género *Cylindrocarpon* sociadas a los decaimientos de la vid (*N. macrodidymum*, *C. liriodendri* y *C. olidum*).

5. Según nuestros datos, la presente memoria constituye el primer trabajo en el que se ha aislado *C. olidum* en España, a partir de cepas con síntomas de enfermedades de la madera.

6. Se ha puesto a punto una PCR múltiple que permite detectar en una única reacción *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*, hongos asociados a la enfermedad de Petri en planta joven.

7. Se ha diseñado un sistema de RTi-PCR que permite detectar *P. chlamydospora* a partir de cantidades mínimas de ADN, descritos hasta el momento.

8. Se ha demostrado que existe escasa variabilidad genética entre los aislados de *P. chlamydospora* en base a patrones RAPD, región ITS,  $\beta$ -tubulina y factor de elongación 1 $\alpha$ , siendo éste el primer trabajo en el que se ha estudiado la secuencia de este factor de elongación en aislados de *P. chlamydospora*.

**9.** Se ha puesto a punto un sistema de inoculación de material vegetal *in vitro* que permite el ensayo de la actividad de distintas materias activas como posibles fungicidas frente a los hongos asociados a los decaimientos de la vid.

**10.** Se ha demostrado la eficacia del fungicida comercial Escudo<sup>®</sup> frente a todos los hongos ensayados excepto frente a *S. hirsutum*, debiéndose su actividad fungicida principalmente a la actividad de Carbendazima, compuesto que junto con Flusilazol, constituye la mezcla comercial.

Los resultados presentados en esta memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones:

**-Martín MT., de la Iglesia E., Carrillo N., Rodríguez L., Fernández M. y Cobos R.** (2005). Apuntes sobre enfermedades de madera de vid. *Tierras de Castilla y León*, **119**: 22-32.

**-Martín MT., de la Iglesia E., Carrillo N., Rodríguez L., Fernández M., Velasco M., Vega M.V. y Cobos R.** (2005). Apuntes sobre los decaimientos de la vid. *folletos Itacyl*, pp 1-51.

**-Cobos R., Rodríguez L. y Martín MT.** (2007). Evolución de los decaimientos de la vid. *Tierras de Castilla y León*, **132**: 108-116.

**-Martín M.T. y Cobos R.** (2007). Identification of fungal species associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, **46**: 18-25.

**-Martín M.T. y Cobos R.** (2007). Aplicación de métodos moleculares en la identificación de hongos asociados al decaimiento de la vid. *Innovación y tecnología agroalimentaria*, **1**: 33-39.

**-Cobos R. y Martín M.T.** (2008). Molecular characterisation of *Phaeomoniella chlamydospora* isolated from grapevines of Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, **47**: 20-27.

**-Martín, M. T., López, N., García, M.C., Martín, L., de Francisco M.T. Cobos, R.** Evolución de los decaimientos de la vid en Castilla y león. *Tierras de Castilla y León* **142**, 118-124.

**-Martín M.T., López, N. y Cobos R.** Effects of three fungicides on 14 fungal isolates associated with grapevine decline *Phytopathologia Mediterranea*, *in press*.



## **Bibliografía**



- Alaniz, S., León, M., Vicent, A., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P. y Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, **91**: 1187-1193.
- Alves, A., Henriques, I., Fragoeiro, S., Santos, C., Phillips, A.J. y Correia, A. (2004). Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting for molecular discrimination of members of the genera *Phaeocremonium* and *Phaeomoniella*. *Plant Pathology*, **53**: 629-634.
- Alves, A., Phillips, A.J., Henriques, I. y Correia, A. (2005). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiology Letters*, **245**: 221-229.
- Arias Giralda, A. (1998). Eutipiosis. En: *Los parásitos de la vid: estrategias de protección razonada*. 5ª edición, pp. 193-195. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi-Prensa.
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F. y García-Jiménez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, **40** (3): 325-329.
- Aroca, A. y Raposo, R. (2005). Hongos patógenos detectados en plantas de vivero de vid. *Phytoma*, **167**: 56-59
- Aroca, A. y Raposo, R. (2007). PCR-Based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2.911-2.918.
- Baker, K. F. y Cook, R.J. (1974). Biological control of plant pathogens, p. 433. Freeman, W.H. and Company, San Francisco.
- Barr, M.E. (1987). Prodomus to the class *Loculoascomycetes*. Department of Botany, University of Massachusetts, Amherst.
- Bertelli, E., Mugnai, L. y Surico, G. (1998). Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea*, **37**: 79-82.
- Borie, B., Jacquot, L., Jamaux-Despréaux, I., Larignon, P. y Péros, J.P. (2002). Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant pathology*, **51**: 85-96.
- Calzarano, F., Di Marco, S. y Cesari, A. (2004). Benefit of fungicide treatment after trunk renewal of vines with different types of esca necrosis. *Phytopathologia Mediterranea*, **43** (1): 116-124.
- Carbone, I. y Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, **91** (3): 553-556.

- **Carter, M. V.** (1991). The status of *Eutypa lata* as a pathogen. International Mycological Institute. *Phytopathological Paper* **32**. CAB International, Wallingford, England.
- **Chiarappa, L.** (2000). Esca (Black Measles) of grapevine: An overview. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 11-15.
- **Cobos, R., Rodríguez, L. y Martín, M.T.** (2007). Evolución de los decaimientos de la vid en Castilla y León. *Tierras de Castilla y León*, **132**: 108-116.
- **Cobos, R. y Martín, M.T.** (2008). Molecular characterisation of *Phaeomoniella chlamydospora* isolated from grapevines in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, **47**: 20-27.
- **Crous, P.W., Gams, W., Wingfield, M.J. y Van Wyk, P.S.** (1996). *Phaeoacremonium* gen.nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*, **88** (5): 786-796.
- **Crous, P.W. y Gams, W.** (2000). *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a casual organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 112-118.
- **Crous, P.W., Swart, L. y Coertze, S.** (2001). The effect of water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings. *Phytopatologia Mediterranea*, **40** (3): 464-466.
- **Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W., Phillips, A.J., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. y Groenewald, J.Z.** (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeria*. *Studies in Mycology*, **55**: 235-253.
- **Darrieutort, G. y Lecomte, P.** (2007). Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopatologia Mediterranea*, **46** (1): 50-57.
- **Denman, S., Crous, P.W., Taylor, J.E., Kang, J.C., Pascoe, I. y Wingfield, M.J.** (2000). An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, **45**: 129-140.
- **Deswarte, C., Canut, H., Klabe, A., Roustain, J.P. y Fallot, J.** (1996). Transport, cytoplasmic accumulation and mechanism of action of the toxin eutypine in *Vitis vinifera* cells. *Arch Biochem Biophys.*, **149**: 336-342.
- **Di Marco, S. y Osti, F.** (2007). Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeomoniella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopatologia Mediterranea*, **46** (1): 73-83.
- **Dubos, B.** (2002). Maladies cryptogamiques de la vigne. Ed. Feret. Bordeaux.
- **Dubrovsky, S. y Fabritius A.L.** (2007). Occurrence of *Cylindrocarpon* spp. in nursery grapevines in California. *Phytopathologia Mediterranea*, **46** (1): 84-86.

- **Dula, T., Kappes, E.M, Horvath, A. y Rabai, A.** (2007). Preliminary trials on treatment of esca-infected grapevines with trunk injection of fungicides. *Phytopathologia Mediterranea*, **46** (1): 91-95.
- **Dupont, J., Laloui, W., Magnin, S., Larignon, P. y Roquebert, M.F.** (2000). *Phaeoacremonium viticola*, a new species associated with esca disease of grapevine in France. *Mycologia* **92** (3): 499-504.
- **Edwards, J., Constable, F., Wiechel, T. y Salib, S.** (2007). Comparison of the molecular tests—single PCR, nested PCR and quantitative PCR (Sybr®Green and Taqman®) for detection of *Phaeomoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. *Phytopathologia Mediterranea*, **46** (1): 58–72
- **Eriksson, O.E.** (1981). The families of bitunicate ascomycetes. *Opera Botanica*, **60**: 1-220.
- **Evidente, A., Sparapano, L., Andolfi, A. y Bruno, G.** (2000). Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 162-168.
- **Fallot, J., Deswarte, C., Dalmayrac, S., Colrat, S. y Roustan, J.P.** (1997). L'Eutypiose de la vigne: isolement d'une molecule synthetise'e par *Eutypa lata* et toxique pour la vigne. *C. R. Acad. Sci. Ser. III*, **320**: 149–158.
- **Fischer, M.** (1996). On the species complexes within *Phellinus*: *Fomitiporia* revisited. *Mycological Research* **100**: 1.459–1.467.
- **Fourie, P.H., Halleen, F., Van der Vyver, J. y Schreuder, W.** (2001). Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, **40** (3): 473-478.
- **Fourie, P.H. y Halleen, F.** (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian plant pathology*, **33**: 313-315.
- **Fourie, P.H. y Halleen, F.** (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, **116**: 255-265.
- **García Jiménez, J.** (2004). Enfermedades fúngicas de la madera. En: *Los parásitos de la vid: estrategias de protección razonada*. 5ª edición pp. 221-228. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi-Prensa.
- **Glass, N.L. y Donaldson, G.C.** (1995). Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, **61** (4): 1.323-1.330.
- **Graniti, A., Surico, G. y Mugnai, L.** (2000). Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 16–20.

- **Grasso, S. y Magnano di San Lio, G.** (1975). Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* su piante di vite in Sicilia. *Vitis*, **14**: 36-39.
- **Groenewald, M., Bellstedt, D.U. y Crous, P.W.** (2000). A PCR-based method for the detection of *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevines. *South African Journal of Science*, **96**: 43-46.
- **Groenewald, M., Kang, J.C., Crous, P.W. y Gams, W.** (2001). ITS and  $\beta$ -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*. *Mycological Research*, **105**: 651-657.
- **Halleen, F., Schroers, H.J., Groenewald, J.Z. y Crous, P.W.** (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (Neonectria) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology*, **50**: 431-455.
- **Halleen, F., Fourie, P.H. y Crous, P.W.** (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, **45** (Supplement): 55-67.
- **Halleen, F., Schroers, H.J., Groenewald, J.Z., Rego, C., Oliveira, H. y Crous, P.W.** (2006). *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevine. *Studies in Mycology*, **55**: 227-234.
- **Hamelin, B.** (1996). Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. *Applied and environmental microbiology*, **62** (11): 4.026-4.031.
- **Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. y Williams, P.M.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6** (10): 986-994.
- **Hewitt, W.B. y Pearson, R.C.** (1990). Phomopsis cane and leaf spot. En: *Compendium of Grape Diseases*, pp 17-18. Pearson, R.C. y Goheen, A.C. Eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- **Hewitt, W.B.** (1996). Secado del sarmiento por Diplodia y Podredumbre ácida del racimo. Diplodia Cane Dieback and Bunch Rot. En: *Plagas y enfermedades de la vid*, pp 25-26. Pearson, R.C. y Goheen, A.C. Eds. American Phytopathological Society. APS Pres - Mundi Prensa. Madrid.
- **Hidalgo, L.** (2002). Tratado de Viticultura General. 3ª edición. Editorial Mundi-Prensa S.A.
- **Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. y Griffith, R.** (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, **10** (4): 413-417.
- **Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R.** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**(9): 1.026-1.030.
- **Jacobs, K.A. y Rehner, S.A.** (1998). Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of Botryosphaeria and related taxa. *Mycologia*, **90** (4): 601-610.

- **Jaspers, M.V.** (2001). Effect of fungicides, in vitro, on germination and growth of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, **40** (3): 453-458.
- **Kelly, A., Alcalá-Jiménez, A.R., Bainbridge, B.W., Heale, J.B., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R.M.** (1994). Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris infecting chickpea. *Phytopathology*, **84**: 1.293-1.298.
- **Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gora, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B. y Hedgpeth, J.** (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 655-661.
- **Larignon, P. y Dubos, B.** (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.*, **103**: 147-157.
- **Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L. y Dubos, B.** (2001). Observation on black dead arm in french vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* **40** (3): 336-342.
- **Laukart, N., Edwards, J., Pascoe, I.G. y Nguyen, N.K.** (2001). Curative treatments trialed on young grapevines infected with *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia mediterranea*, **40** (3): 459-463.
- **Lecomte, P., Péros, J.P., Blancard, D., Bastien, N. y Délye, C.** (2000). PCR assays that identify the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *Applied and environmental microbiology*, **66** (10): 4.475-4.480.
- **Lehozcky, J.** (1996). Black Dead Arm. En: *Plagas y enfermedades de la vid*, p. 35. Pearson, R.C. y Goheen, A.C. (Eds). American Phytopathological Society. APS Pres - Mundi Prensa. Madrid.
- **Leung, H., Nelson, R.J. y Leach, J.E.** (1993). Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. En: *Advances in Plant Pathology*, vol. 10, pp. 157-205. Academic Press, New York, USA.
- **Luque, J., Martos, S. y Phillips, A.** (2005). *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia*, **97** (5): 1.111-1.121.
- **Luque, J., Sierra, D., Torres, E. and García, F.** (2006). *Cryptovalsa ampelina* on grapevines in N.E. Spain: Identification and pathogenicity. *Phytopathologia Mediterranea*, **45** (Supplement): 101-109.
- **Luttrell, E.S.** (1951). Taxonomy of the Pyrenomycetes. *University of Missouri Studies, Science Series*, **24**: 1-120.
- **Luttrell, E.S.** (1955). The ascostromatic *Ascomycetes*. *Mycologia*, **47**: 511-532.

- **Martín, M.T., de la Iglesia, E., Carrillo, N., Rodríguez, L., Fernández, M., Cobos, R.** (2005). Apuntes sobre enfermedades de madera de vid. *Tierras de Castilla y León*, **119**: 22-32.
- **Martín, M.T. y Cobos, R.** (2007). Decaimiento de la vid en Castilla y León, estudio del efecto de un fungicida. *XXXII Reunión del grupo de la vid*. Zamora.
- **Martos, S., Andolfi A., Luque J., Mugnai L., Surico G. y Evidente A.** (2008). Production of phytotoxic metabolites by five species of *Botryosphaeriaceae* causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology*, **121** (4): 451.
- **McCarthy, C.** Chromas versión 1.45 (1996-1998). School of Health Sciences, Griffith University, Gold Coast Campus, Southport, Queensland, Australia.
- **McDonald, B.A.** (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, **87**: 448-453.
- **McLean, D.J., Braithwaite, K.S., Manners, J.M. y Irwin, J.A.** (1993). How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis? En: *Advances in Plant Pathology*, vol. 10, pp. 207-244. Academic Press, New York, USA.
- **Miller, J.H.** (1928). Biologic studies in the *Sphaeriales* I. *Mycologia* **20**:187–213.
- **Mostert, L., Crous, P.W., Kang, J.C. y Phillips, A.J.** (2001). Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia*, **93**: 146-167.
- **Mostert, L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Gams, W. y Summerbell, R.C.** (2003). *Togninia* (Calosphaeriales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia*, **95** (4): 646-659.
- **Moyano, C., Alfonso, C., Gallego, J., Raposo, R. y Melgarejo, P.** (2003). Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis Cinerea* populations. *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 515–522.
- **Mugnai, L., Graniti, A. y Surico, G.** (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, **83**: 404–418.
- **Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. y Erlich, H.A.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, **51** (1):263–273.
- **Nei, M. y Li, W. H.** (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 5.269-5.273.



- **Nita, M., Ellis, M.A., Wilson, L.L. y Madden, L.V.** (2006). Evaluation of a Disease Warning System for Phomopsis Cane and Leaf Spot of Grape: A Field Study. *Plant Disease*, **90** (9): 1.239-1.246.
- **O'Donnell, K.** (1993) Fusarium and its near relatives. En: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, pp. 225-233. Reynolds, D.R. y Taylor, J.W., Eds. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- **O'Donnell, K. y Cigelnik, E.** (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetic Evolution*, **7**:103–116.
- **Overton, B.E., Stewart, E.L., Qu, X., Wenner, N.G. y Christ, B.J.** (2004). Qualitative real-time PCR SYBR GREEN detection of Petri disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, **43** (3): 403-410.
- **Parry, D.W. y Nicholson, P.** (1996). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*, **45**: 383-391.
- **Pascoe, I. y Cottral, E.** (2000). Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 68-75.
- **Pérez Marín, J.L.** (2004). Excoriosis (*Phomopsis viticola* Sacc.). En: *Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada*, pp. 217-220. M.A.P.A. Mundi Prensa. Madrid.
- **Péros, J. P. y Berger, G.** (1994). A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine to Eutypa dieback. *Agronomie*, **14**: 515-523.
- **Péros, J. P., Jamaux-Despréaux, I. y Berger, G.** (2000). Population genetics of fungi associated with esca disease in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 150-155.
- **Petit, E. y Gubler, W.D.** (2005). Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease*, **89**: 1.051–1.059.
- **Phillips, A.J., Alves, A., Correia, A. y Luque, J.** (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, **97** (2): 513-529.
- **Phillips, A.J., Crous, P.W. y Alves, A.** (2007). *Diplodia seriata*, the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusa*. *Fungal diversity*, **25**: 141-155.
- **Pollastro, S., Abbatecola, A., Dongiovanni, C. y Faretra, F.** (2000). Usage of molecular markers (PCR-RAPD) for studying genetic variability in *Phellinus* (*Fomitiporia*) sp. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 107-111.

- Pollastro, S., Dongiovanni, C., Abbatecola, A., De Guido, M.A., De Miccolis, R.M., Angelini, P. y Faretra F. (2001). Specific SCAR primers for fungi associated with wood decay of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, **40** (3): 362-368.
- Pottinger, B., Stewart, A., Carpenter, M. y Ridgway, H.J. (2002). Low genetic variation detected in New Zealand populations of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, **41** (3): 199-211.
- Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A. y Phillips, A.J. (2000). Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 76-79.
- Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T., Cabral, A. y Oliveira, H. (2006). Black foot of grapevine: sensivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea*, **45** (Supplement): 93-100.
- Ridgway, H. J., Steyaert, J.M., Pottinger, B., Carpenter, M., Nicol, D. y Stewart, A. (2005). Development of an isolate-specific marker for tracking *Phaeomoniella chlamydospora* infection in grapevines. *Mycologia*, **97** (5): 1.093-1.101.
- Rooney, S. y Gubler, W.D. (2001). Effect of hot water treatments on eradication of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood. *Phytopathologia Mediterranea*, **40** (3): S467-S472.
- Saccardo P.A. (1877). Fungi Veneti novi vel critici. *Michelia*, **1**: 1-72.
- Saccardo P.A. (1915). Notae mycologicae. *Annales Mycologici*, **13**: 115-138.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Sharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- Santiago, Y., Martín, M.C., Moreno, C.M. y Peláez, H. (2004). Valoración de los daños de decaimiento de la vid. *Tierras de Castilla y León*, **103**: 34-44.
- Schilling, A.G., Moller, E.M. y Geiger, H.H. (1996). Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology*, **86**: 515-522.
- Schmittgen, T. (2001) Real-Time quantitative PCR. *Methods*, **25**: 383-385.
- Sparapano, L., Bruno, G., Ciccarone, C. y Graniti, A. (2000a). Infection of grapevines by some fungi associated with esca. I. *Fomitiporia punctata* as a wood-rot inducer. *Phytopatologia Mediterranea*, **39** (1): 46-52.
- Sparapano, L., Bruno, G., Ciccarone, C. y Graniti, A. (2000b). Infection of grapevines by some fungi associated with esca. II. Interaction among *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopatologia Mediterranea*, **39** (1): 53-58.

- **Surico, G., Bandinelli, R., Braccini, P., Di Marco, S., Marchi, G., Mugnai, L. y Parrini, C.** (2004). On the factors that may have influenced the esca epidemic in Tuscany in the Eighties. *Phytopathologia Mediterranea*, **43** (1): 136–143.
- **Surico, G., Mugnai, L. y Marchi, G.** (2006). Older and more recent observations on esca: A critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*, **45** (Supplement): 68–86.
- **Tabacchi, R., Fkyerat, A., Poliard, C. and Dubin, G.M.** (2000). Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 156-161.
- **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1.596-1.599.
- **Tegli, S.** (2000). A hypothesis about the reproductive modes of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (2): 289–298.
- **Tegli, S., Bertelli, E. y Surico, G.** (2000a). Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 134-149.
- **Tegli, S., Santilli, E., Bertelli, E. y Surico, G.** (2000b). Genetic variation within *Phaeoacremonium aleophilum* and *P. chlamydosporum* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, **39** (1): 125–33.
- **Theissen, F. y Sydow, H.** (1915). Die Dothideales. *Annales Mycologici* **13**: 149–746.
- **Theissen, F.** (1916). Mykologische Abhandlungen. *Verhandlungen der Kaiserlich-Königlichen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien*, **66**: 296-400.
- **Thompson, J. R. y Latorre, B. A.** (1999). Characterization of *Botrytis Cinerea* from table grapes in Chile using RAPD-PCR. *Plant Disease*, **83**: 1.090-1.094.
- **Trapero, A.** (2000). Los hongos fitopatógenos. En: *Patología vegetal*, pp. 713-738. Tomo II. Llacer, G., López, M.M., Trapero, A. y Bello, A. Sociedad Española de Fitopatología. Mundi-Prensa. Madrid.
- **Tyagi, S. y Kramer, F.R.** (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, **14**:303-308.
- **Vakalounoakis, D.L. y Fragkiadakis, G.A.** (1999). Genetic differentiation of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology*, **89**: 161-168.
- **Van de Peer, Y. y De Wachter, R.** (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)* **10**: 569-570.

- **Van Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Halleen, F. y Crous, P.W.** (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, **45** (Supplement): 43–54.
- **Von Arx, J.A.** (1987). Plant pathogenic fungi. *Berlin. J. Cramer*.
- **Von Arx, J.A. y Müller, E.** (1975). A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. *Studies in Mycology*, **9**: 1-159.
- **Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T. y Little, S.** (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.*, **17**: 804-807.
- **White, T. J., Bruns, T., Innis, M.A., Lee, S. y Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp 315-322.
- **Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalsky, J.A. y Tingey, S.V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6.531-6.535.
- **Whiting, E.C., Khan, A. y Gubler, W.D.** (2001). Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Disease*, **85**: 195–201.
- **Wittwer, C.R., Herrmann, M.G., Moss, A.A. y Rasmussen, R.P.** (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, **22**:130-139.



